

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DES LIPOPROTÉINES DANS LE MÉTABOLISME NORMAL
ET PATHOLOGIQUE DU TISSU OSSEUX

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR
MATHIEU BRODEUR

MARS 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Robert Moreau, de m'avoir accueilli dans son laboratoire et également pour m'avoir laissé la latitude nécessaire à un étudiant de doctorat.

J'en profite également pour remercier ma co-directrice de recherche, le Dr Louise Brissette, qui a contribué de manière inestimable à la réalisation de ce projet de doctorat en m'apportant une rigueur de travail, et également en me permettant de m'impliquer dans la réalisation et l'élaboration de projets reliés à son laboratoire. Cette expérience et cette collaboration me sera sans aucun doute utile tout au long de ma carrière future.

Je tiens également à remercier Madame Louise Falstrault qui m'a fourni tout au long de mon doctorat de judicieux conseils qui m'ont permis de mener à terme ce projet.

Je tiens également à remercier mes collègues de laboratoires pour tous les bons moments que j'ai passés avec eux. Votre présence a ainsi rendu mon travail plus facile et plus agréable. Merci à Dominique, Pascale, Veneta et plus particulièrement Vilay qui a grandement contribué à l'aboutissement de ce doctorat de par son aide technique et également ses encouragements répétés.

Enfin, je tiens à remercier David Rhains qui, de part ses grandes connaissances et nos conversations a facilité la réalisation de ce doctorat. De plus, je ne peux oublier l'aide inestimable de Marie-Claude St-Louis, qui m'a apportée de judicieux conseils techniques et qui m'a également soutenu moralement dans les moments un peu plus difficile.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
1.Le tissu osseux et les os :	1
2.Le remodelage osseux :	2
2.1.Les ostéoclastes :	2
2.2.Les ostéoblastes :	6
2.2.1.Régulation de la résorption osseuse par les ostéoblastes :	8
3.Les lipoprotéines :	12
4.Métabolisme des lipoprotéines :	15
4.1.Captation globale des lipoprotéines natives :	16
4.2.Captation sélective des EC des lipoprotéines natives:	18
4.2.1.Le récepteur scavenger de classe B et de type 1 (SR-BI) :	19
4.2.2.Le cluster of differentiation 36 (CD36) :	24
5.Implication des lipoprotéines dans le métabolisme osseux :	27
5.1.Rôle des lipoprotéines dans les fonctions ostéoblastiques :	27
5.2.Impact pathologique des lipoprotéines :	30
6.Les LDL oxydées :	31
6.1.Impact cellulaire des LDLOx :	35
6.1.1.Impact des LDLOx sur la différenciation ostéoblastique :	35
6.1.2.Impact des LDLOx sur la survie cellulaire :	36

6.1.3. Impact des LDLOx sur la mort cellulaire :	38
6.2. Récepteurs des LDL oxydées :	43
6.2.1. Le « cluster of differentiation 36 » (CD36) :	45
6.2.2. Le récepteur <i>scavenger</i> de classe B et de type I (SR-BI) :	46
7. Buts et objectifs généraux :	47
CHAPITRE II: Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL ₃ .	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUCTION	54
2. EXPERIMENTAL PROCEDURES	57
2.1. Materials :	57
2.2. Primary culture of mouse osteoblasts (mOB) :	58
2.3. Cell culture :	58
2.4. Isolation and radiolabelling of lipoproteins :	58
2.5. Lipoprotein modification :	59
2.6. Lipoprotein binding assays :	60
2.7. Competition assays :	60
2.8. Cellular lipoprotein association and degradation assays :	61
2.9. Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) :	61
2.10. Immunoblotting :	62
2.11. Protein fractionation by discontinuous sucrose gradient :	62
2.12. Other methods :	63
3. RESULTS	63
3.1. Binding of lipoproteins to osteoblastic cells :	63
3.2. Competition association assay :	65
3.3. Mechanisms of lipoprotein uptake and their fate in osteoblastic cells :	67
3.4. Expression of scavenger receptors in osteoblastic cells :	69

3.5. Cross-competition selective uptake assay :	71
3.6. Uptake of estradiol associated to lipoproteins (LDL and HDL ₃) :	73
4. DISCUSSION.....	76
ACKNOWLEDGMENTS.....	82
CHAPITRE III: Influence of oxidized LDL on the viability of osteoblastic cells.....	83
ABSTRACT.....	84
1. INTRODUCTION.....	84
2. EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	87
2.1. Materials :	87
2.2. Osteoblast cell culture :	87
2.3. Isolation and radiolabelling of lipoproteins :	88
2.4. Lipoprotein modification :	88
2.5. Oxidation of LDL by MG-63 cells :	89
2.6. Lipoprotein cell association and degradation assays :	89
2.7. MTT activity and proliferation assays :	90
2.8. Cell death assays :	91
2.9. Evaluation of lysosomal integrity by acridine orange staining :	92
2.10. Other methods :	92
3. RESULTS.....	92
3.1. OxLDL metabolism by osteoblastic cells :	92
3.2. Effect of LDL and OxLDL on the MTT reduction activity by osteoblastic cells:.....	95
3.3. The stimulation of osteoblast proliferation by OxLDL :	97
3.4. Osteoblastic cell death induction by OxLDL :	99
3.5. Impact of OxLDL on lysosomal membrane stability :	99
3.6. Oxidation of LDL by MG-63 cells :	102
4. DISCUSSION.....	105

CHAPITRE IV: HDL ₃ reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death.....	110
ABSTRACT.....	111
1.INTRODUCTION.....	111
2.EXPERIMENTAL PROCEDURE.....	115
2.1.Materials :.....	115
2.2.Osteoblast cell culture :.....	116
2.3.Isolation and radio labeling of lipoproteins :.....	116
2.4.Lipoprotein modification :	116
2.5.Competition assays :	117
2.6.MTT activity assays :.....	117
2.7.Cholesterol efflux assay :	118
2.8.Cellular lipoprotein association assays :	118
2.9.Evaluation of lysosomal integrity by acridine orange staining :	118
2.10.Immunoblotting :	119
2.11.Other methods :	119
3.RESULTS.....	119
3.1.HDL offset cell death induced by OxLDL :.....	119
3.2.Competition association assays :	123
3.3.Evaluation of cholesterol efflux as a protective mechanism against OxLDL-induced cell death :	125
3.4.Effect of pre-incubation of cells with HDL ₃ on OxLDL induced cell death :	127
3.5.Impact of HDL on the metabolism of OxLDL by osteoblastic cells :	127
3.6.Impact of HDL ₃ on lysosomal membrane stability :	129
4.DISCUSSION.....	133
5.ACKNOWLEDGMENTS	138
CHAPITRE V.....	139

DISCUSSION.....	139
1.Importance des lipoprotéines dans les fonctions des ostéoblastes :	139
1.1.Implication du métabolisme des lipoprotéines dans les fonctions ostéoblastiques :	141
1.2.Implication des lipoprotéines dans l'acheminement de l'oestrogène aux ostéoblastes :	144
2.Impact des lipoprotéines dans le développement de l'ostéoporose :	146
2.1.Détermination de la capacité des ostéoblastes à effectuer le métabolisme des LDLOx :	148
2.2.Impact du métabolisme des LDLOx sur la survie des ostéoblastes :	149
3.Impact des HDL sur le métabolisme osseux :	154
3.1.Effet protecteur des HDL sur la mort ostéoblastique induite par les LDLOx :	155
CONCLUSIONS.....	157
RÉFÉRENCES.....	161
ANNEXE I : Focus on the estradiol fatty acid esters: A Comment on Brodeur <i>et al.</i> (2008): Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL ₃	197
ANNEXE II: A matter of degree: A commentary on Influence of oxidized low- density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. ...	202

LISTE DES ABRÉVIATIONS

apo	apolipoprotéine
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CETP	protéine de transfert des esters de cholestérol
c-fms	récepteur du facteur stimulant la croissance des macrophages
CL	cholestérol libre
EC	ester de cholestérol
ERK	kinase régulée par un signal extra-cellulaire
FGF	facteur de croissance fibroblastique
HDL	lipoprotéine de haute densité
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
Insig	protéine de rétention du réticulum endoplasmique
LCAT	lécithine cholestérol acyl transférase
LDL	lipoprotéine de faible densité
LDLOx	lipoprotéine de faible densité oxydée
LPL	lipoprotéine lipase
LRP	protéine apparentée au récepteur des LDL
M-CSF	Facteur stimulant la colonie des macrophages
MTT	transformation mitochondriale du jaune de tétrazolium
NO	oxyde nitrique
OPG	ostéoprotégérine
P53	protéine p53
PL	phospholipide
PPAR	récepteur au facteur activé de prolifération des peroxysomes
TGF	facteur de croissance tumoral
RANKL	ligand de l'activateur du récepteur NF- κ B
RANK	récepteur de l'activateur du récepteur NF- κ B

RE	réticulum endoplasmique
rLDL	récepteur des lipoprotéines de faible densité
ROS	produit réactif oxygéné
SCAP	protéine activant le clivage de la SREBP
SMC	cellule musculaire lisse
SR-BI	récepteur <i>scavenger</i> de classe B et de type I
SREBP	protéine liant les éléments de réponse au stérol
TG	triglycéride
TGF	facteur de croissance tumoral
VLDL	lipoprotéine de très faible densité

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I :

Figure 1.1 : Régulation de l'ostéoclastogenèse par les ostéoblastes.....3

Figure 1.2 : Le remodelage osseux.....10

CHAPITRE II :

Figure 2.1 : Competition curves of ^{125}I -LDL (A) and ^{125}I -HDL₃ (B) association with MG-63 cells by unlabelled LDL, OxLDL and HDL₃.....66

Figure 2.2 : Lipoprotein degradation (panel A), ^{125}I -lipoprotein association (panel B), ^3H -CE-lipoprotein association (panel C) and ^3H -CE-lipoprotein association due to cholesteryl ester selective uptake (panel D) in osteoblastic cells.....68

Figure 2.3 : Determination of mRNA and protein expression for SR-BI, SR-BII and CD36 in osteoblastic cells.....70

Figure 2.4 : Immunoblotting of MG-63 and MC3T3-E1 cell proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient.....72

Figure 2.5 : Selective uptakes of ^3H -CE-LDL (panel A) and ^3H -CE-HDL₃ (panel B) in the presence of LDL, OxLDL and HDL₃ by MG-63 and MC3T3-E1 cells.....73

Figure 2.6 : Determination of the uptake mechanism of lipoprotein-associated estradiol by osteoblastic cells.....75

Figure 2.7 : Schematic representation of the selective uptake of CE and estradiol associated with lipoproteins by osteoblastic cells.....	81
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE III :

Figure 3.1 : ^{125}I -lipoprotein association (panel A), ^3H -CE-lipoprotein association (panel B), ^3H -CE-lipoprotein association due to cholesteryl ester selective uptake (panel C) and lipoprotein degradation (panel D) in MG-63 and MC3T3-E1 cells.....	93
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 3.2 : Effect of native LDL and oxidized LDL on osteoblastic MTT activity.....	96
--------------------------------------------------------------------------------------	----

Figure 3.3 : OxLDL induced proliferation of MG-63 cells.....	98
--------------------------------------------------------------	----

Figure 3.4 : OxLDL induced apoptosis of MG-63 cells.....	100
----------------------------------------------------------	-----

Figure 3.5 : Impact of OxLDL on lysosomal membrane integrity.....	101
-------------------------------------------------------------------	-----

Figure 3.6 : Effect of oxidized LDL on osteoblastic MTT activity in the presence of chloroquine.....	103
------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 3.7 : LDL oxidation induced by MG-63 cells.....	104
--------------------------------------------------------	-----

CHAPITRE IV:

Figure 4.1 : Effect of HDL ₃ and LDL on OxLDL-induced osteoblastic cell death.....	120
-----------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 4.2 : Effect of HDL ₃ on OxLDL-induced osteoblastic cell death.....	122
---------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 4.3 : Competition curves of ^{125}I -mildly-OxLDL (A) and ^{125}I -standardly-OxLDL (B) association with MG-63 cells by unlabeled OxLDL, LDL and HDL ₃	124
Figure 4.4 : Importance of cholesterol efflux in the protecting effect of HDL ₃	126
Figure 4.5 : Effect of HDL ₃ pre-treatment on OxLDL-induced osteoblastic cell death.....	128
Figure 4.6 : Impact of HDL ₃ on SR-BI and CD36 expression in MG-63 cell.....	130
Figure 4.7 : Effect of HDL ₃ on ^{125}I -lipoprotein association, ^3H -CE-lipoprotein association and ^3H -CE-lipoprotein association due to cholesteryl ester selective uptake in MG-63 cells.....	131
Figure 4.8 : Effect of HDL ₃ on OxLDL-induced lysosomal membrane damage.....	132
 CHAPITRE V:	
Figure 5.1 : Représentation schématique des effets pathologiques et bénéfiques des lipoprotéines.....	158

LISTE DES TABLES

CHAPITRE I :

Table 1.1. : Table récapitulative des différents récepteurs scavengers répertoriés.....	44
-----------------------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE II :

Table 2.1. : Parameters of LDL, modified LDL and HDL ₃ binding to MG-63 and MC3T3-E1 cells.....	64
------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RÉSUMÉ

Les os, qui sont à la fois résistants et légers, assurent des fonctions mécaniques, structurales et métaboliques. Afin d'assurer ces fonctions, les os sont soumis à un remodelage continu qui implique la destruction (résorption), puis la formation d'un nouveau tissu osseux calcifié. Ce processus se produit par l'intermédiaire de cellules spécialisées : les ostéoclastes assurant la résorption osseuse et les ostéoblastes responsables de la formation de nouveau tissu osseux. Ainsi, un déséquilibre entre ces deux processus mène, dans bien des cas, à l'ostéoporose qui est une pathologie caractérisée par une faible densité minérale des os et également par une baisse de la masse osseuse. Récemment, différentes études ont permis de démontrer que les lipoprotéines sont impliquées dans le maintien de l'intégrité osseuse. En effet, il a été démontré que les chylomicrons permettent de réguler la formation osseuse en assurant l'acheminement de la vitamine K aux ostéoblastes. Le transfert de cette vitamine se fait par un processus de captation globale qui consiste en la prise de la lipoprotéine en son entier, contrairement à la captation sélective où seulement les esters de cholestérol (EC) de la lipoprotéine sont transférés à la cellule. Ce processus de prise sélective est surtout attribué au récepteur *scavenger* de classe B (SR-B). Cette famille inclut les récepteurs *scavenger* de classe B et de type I et II (SR-BI et SR-BII) ainsi que le *cluster of differentiation-36* (CD36). Ces récepteurs ont la capacité de prendre de façon sélective les EC contenus dans les lipoprotéines de faible et de haute densité (respectivement les LDL et HDL). Cependant, l'expression de ces récepteurs et le rôle des LDL et HDL dans les fonctions ostéoblastiques demeurent à ce jour inexplorés, malgré le fait que ce sont deux classes de lipoprotéines abondantes chez l'humain et qui sont en plus reconnues pour transporter de l'œstrogène, une hormone impliquée dans l'activité de formation osseuse des ostéoblastes.

Ainsi, ce projet de doctorat visait d'une part à déterminer si les LDL et les HDL ont la capacité d'acheminer du cholestérol et de l'œstrogène aux cellules ostéoblastiques et par conséquent, de déterminer également l'identité des récepteurs de lipoprotéines impliqués dans ce métabolisme. Pour ce faire, les lipoprotéines ont été marquées au niveau de leur partie protéique et lipidique et des essais d'association, de dégradation et de compétition ont été réalisés. Les résultats obtenus montrent que les ostéoblastes captent le cholestérol contenu dans les LDL et les HDL. De plus, nous avons démontré que cette prise du cholestérol peut se faire autant par captation globale que par captation sélective. En accord avec la présence de ce dernier mécanisme, nous avons démontré que les cellules ostéoblastiques expriment les récepteurs reconnus pour faire de la captation sélective, soit le SR-BI, le SR-BII et le CD36, et que ces derniers sont impliqués dans la captation sélective faite à partir des LDL et des HDL. Nous avons également démontré, par l'incorporation d'estradiol marquée radioactivement dans les LDL et les HDL, que ces lipoprotéines peuvent transférer de

manière sélective l'oestrogène qu'elles contiennent par un processus impliquant aussi les SR-B.

Il a aussi été démontré que les lipoprotéines sont impliquées dans le développement de l'ostéoporose, puisqu'une corrélation positive entre l'ostéoporose et l'athérosclérose a été démontrée par des études épidémiologiques et génétiques ainsi que par des études faites chez la souris. Étant donné que la progression des maladies cardiovasculaires est directement reliée au niveau des LDL en circulation, et que ces lipoprotéines deviennent pro-athérogéniques suite à une modification oxydative, les LDL oxydées (LDLOx) ainsi générées constituent un facteur qui pourrait être responsable du développement parallèle de l'athérosclérose et de l'ostéoporose. D'ailleurs, il a été démontré que la différenciation ostéoblastique est inhibée lorsque les ostéoblastes sont exposés à des LDLOx. Ainsi, le présent projet visait également à caractériser l'impact du métabolisme ostéoblastique des LDLOx sur la viabilité des ostéoblastes. Les résultats obtenus suite à des essais de transformation mitochondriale du jaune de tétrazolium (MTT) et des expériences d'incorporation de thymidine indiquent que les LDLOx induisent la prolifération des cellules ostéoblastiques lorsqu'elles sont présentes à de faibles concentrations. Cependant, à de fortes concentrations, les LDLOx induisent plutôt l'apoptose des ostéoblastes, puisqu'il y a une externalisation de la phosphatidylsérine et de la fragmentation d'ADN. De plus, nous avons montré que cet effet apoptotique provient d'une incapacité des ostéoblastes à effectuer le métabolisme des LDLOx. En effet, les LDLOx sont faiblement dégradées par les ostéoblastes, ce qui entraîne une accumulation lysosomale telle que démontrée par la perte d'intégrité de la membrane des lysosomes. Cette perméabilisation lysosomale est responsable de l'induction de l'apoptose, puisque la présence de chloroquine (agent inhibant l'activité lysosomale) accentue la mort des ostéoblastes.

De plus, puisque certaines études ont démontré l'existence d'une corrélation positive entre les niveaux de HDL en circulation et la densité osseuse, nous avons tenté d'établir si cet effet pouvait provenir d'une inhibition des effets toxiques des LDLOx, telle que rapportée au niveau cardio-vasculaire. Les résultats obtenus montrent que les HDL inhibent l'apoptose induite par les LDLOx. Cet effet protecteur est dû à la capacité des HDL d'empêcher l'association des LDLOx aux ostéoblastes. De plus, nous avons montré que les HDL ont la capacité de moduler le métabolisme des LDLOx et ainsi d'empêcher la mort induite par les LDLOx. En effet, l'exposition des ostéoblastes à des HDL résulte en une hausse de l'expression du SR-BI. Ce changement dans l'expression de ce récepteur entraîne une diminution de l'association protéique des LDLOx et aussi une hausse de la captation sélective faite à partir de ces lipoprotéines modifiées. Ces effets résultent en une préservation de l'intégrité lysosomale qui est perdue en présence de LDLOx. Ainsi, ces données

suggèrent l'importance de maintenir des niveaux de HDL élevés afin de prévenir la mort des ostéoblastes exposés à des conditions athérogéniques.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1. Le tissu osseux et les os :

Les os ont évolués pendant plusieurs centaines de millions d'années pour devenir un tissu remarquable rendant ainsi les vertébrés distincts des autres animaux. Ce tissu à la fois résistant et léger est composé en majeure partie de cristaux d'hydroxyapatite qui est un sel insoluble fait de calcium et de phosphore et qui représente environ 65% de la masse des os adultes. Il est également à noter que les os renferment aussi de petites quantités de magnésium, de sodium et de bicarbonate. En plus de ces sels inorganiques, le tissu osseux renferme également une matrice organique principalement composée de protéines collagèneuses qui assurent la flexibilité aux os et qui représente 10% de la masse de l'os adulte. Enfin, les os contiennent aussi approximativement 25% d'eau (Tortora *et al.* 1993). L'organisation de ces différents composants permet aux systèmes osseux d'assurer de nombreuses fonctions fondamentales. Le tissu osseux fournit ainsi une structure qui apporte un soutien à différents tissus mous tels que le cœur et les poumons, et qui préserve de nombreux organes internes contre les blessures. Ainsi, la boîte crânienne protège l'encéphale et les os du bassin renferment les organes reproducteurs internes. De plus, les os constituent des sites auxquels se rattachent les muscles pour assurer les mouvements des différents membres de l'organisme. En plus de ces fonctions mécaniques, l'os constitue un réservoir pour les différents minéraux de l'individu. Ainsi, les os emmagasinent 99% du calcium et 85% du phosphore présents dans l'organisme. Cette fonction de réservoir du calcium est très importante puisque le bon fonctionnement des muscles et des nerfs est dépendant de la présence de niveaux appropriés de calcium en circulation. Ainsi, en cas de besoin, le calcium peut être libéré du tissu osseux afin de maintenir un équilibre normal en minéraux et également

distribuer ces derniers dans d'autres parties du corps. Enfin, les os ont aussi comme fonction d'incorporer différents minéraux dangereux pouvant nuire à l'organisme (Tortoral *et al.* 1993).

2. Le remodelage osseux :

Bien que les os soient souvent considérés comme étant un matériel inerte, il est maintenant clairement établi que l'os est un organe très dynamique qui est continuellement remodelé. Ce processus de remodelage osseux implique dans un premier temps la destruction de la matrice osseuse (résorption), puis la formation subséquente d'une nouvelle matrice (Rodan et Martin, 2000) (Figure 1.1). Ce processus se produit par l'intermédiaire de cellules spécialisées : les ostéoclastes et les ostéoblastes. Les ostéoclastes sont des cellules que l'on retrouve à la surface de l'os et qui assurent la résorption osseuse. À l'opposé, les ostéoblastes constituent des cellules qui permettent la formation osseuse en venant remplacer la matrice détruite par les ostéoclastes (Jurdic *et al.* 1999). Le remodelage de l'os est donc dépendant d'une bonne coordination entre ces deux types de cellules et est essentiel pour la croissance du squelette, le maintien de la structure de l'os et également pour les différentes fonctions métaboliques accomplies par les os, telles que la régulation de la calcémie. Ainsi, un déséquilibre dans ce processus de remodelage peut résulter en de graves perturbations de la structure et de la fonction du squelette. Ceci pouvant alors entraîner une hausse de la morbidité et par le fait même une diminution de l'espérance de vie. Ainsi, il devient donc impératif de bien comprendre les mécanismes qui régulent l'activité des ostéoclastes et des ostéoblastes.

2.1. Les ostéoclastes :

Les ostéoclastes, découverts en 1873 (Kflliker *et al.* 1873), constituent le seul type cellulaire capable de résorber les os. Ces cellules spécialisées sont issues de

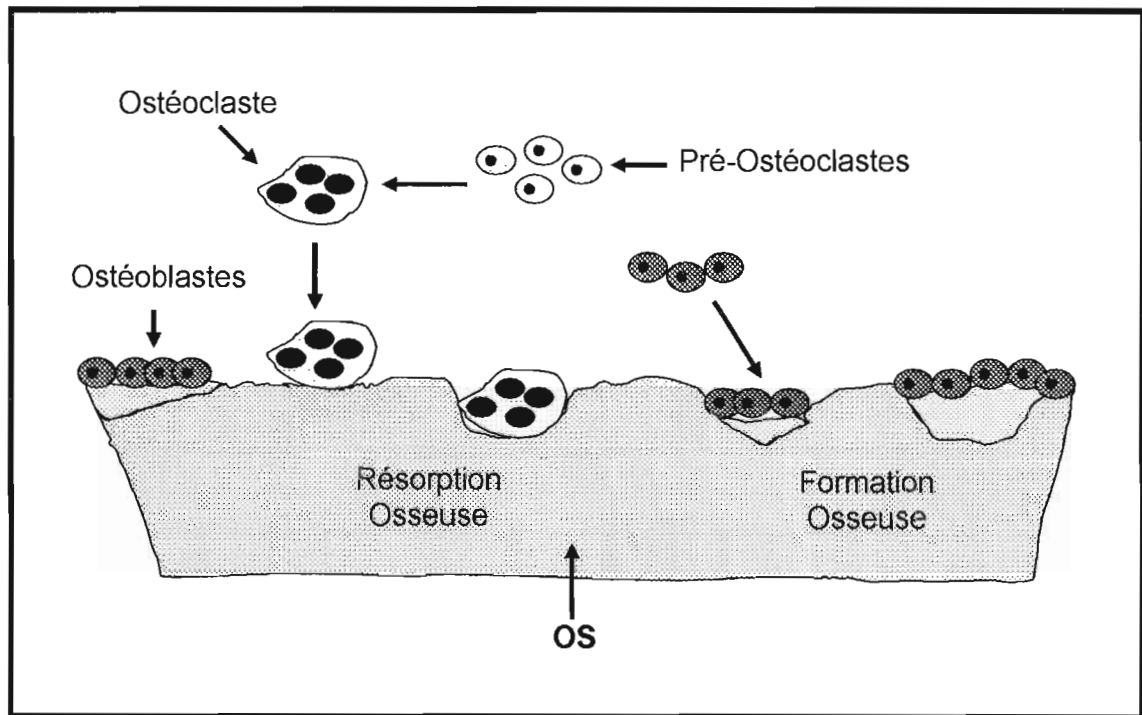


Figure 1.1 : Le remodelage osseux. Le phénomène du remodelage de l'os implique dans un premier temps la stimulation, par différents facteurs, des pré-ostéoclastes qui sous l'influence de ces stimuli fusionnent. Ensuite, ces ostéoclastes migrent et adhèrent à la surface de l'os qu'il résorbe par la sécrétion d'acide chloridrique (HCl) et de différentes enzymes. Suite à cette résorption osseuse, les ostéoblastes vont à cette zone de résorption et y sécrètent différentes protéines collagèneuses et non-collagèneuses à travers desquelles des cristaux minéraux se formeront pour entamer la minéralisation et ainsi la formation d'un nouvel os.

précurseurs hématopoïétiques, tel que démontré par la réduction du nombre d'ostéoclastes lorsque le processus d'hématopoïèse est inhibé (Tondravi *et al.* 1997 ; Yoshida *et al.* 1990). Ces précurseurs des ostéoclastes sont également à l'origine des monocytes/macrophages. En fait, par leur profil immunohistochimique, les ostéoclastes peuvent être considérés comme étant un type de macrophage spécialisé. De plus, il est à noter que le processus de résorption osseuse utilise certains éléments de la machinerie cellulaire typique aux macrophages telle que la phagocytose (Calvani *et al.* 2004 ; Yamane *et al.* 1997). Ainsi, afin d'assurer la formation d'ostéoclastes à partir de ces précurseurs hématopoïétiques, différents facteurs de différenciation spécifiques au développement des ostéoclastes sont requis. L'un de ceux-ci est le facteur nommé *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) qui augmente la prolifération des précurseurs et la survie des ostéoclastes matures via le récepteur *c-fms* qui est exprimé à plusieurs stades du développement des ostéoclastes (Hofstetter *et al.* 1995 ; Kodama *et al.* 1991 ; Lagasse et Weissman, 1997). L'importance de ce facteur dans la génération d'ostéoclastes a été démontrée par l'utilisation de souris *op/op* qui sont caractérisées par une déficience complète en ostéoclastes (Marks *et al.* 1976) qui est causée par une mutation dans le gène du M-CSF. Ce phénotype peut par contre être renversé par l'injection journalière de M-CSF qui provoque alors la formation des ostéoclastes pouvant résorber l'os (Felix *et al.* 1990). Ces résultats démontrent donc clairement que le M-CSF est essentiel pour le recrutement et l'activité des ostéoclastes. Cependant, la seule présence du M-CSF n'est pas suffisante pour assurer la génération des ostéoclastes, puisque les précurseurs mis en présence de M-CSF seul vont se différencier en macrophages (Kodama *et al.* 1991). Ainsi, la formation des ostéoclastes nécessite absolument la présence d'un autre facteur afin d'assurer la génération de ces cellules résorbant les os. La découverte de cet autre facteur s'est faite par l'utilisation d'une co-culture de précurseurs d'ostéoclastes et d'ostéoblastes qui a révélé que la présence du ligand de l'activateur du récepteur NF- κ B (RANKL) était essentielle à la génération d'ostéoclastes matures (Takahashi *et al.* 1988 ; Yasuda *et al.* 1998). En effet, il a été

démontré qu'en présence de M-CSF, RANKL était suffisant et nécessaire pour promouvoir l'ostéoclastogenèse (Jimi *et al.* 1999 ; Matsuzaki *et al.* 1998 ; Quinn *et al.* 1998). Les effets de ce ligand sont assurés par la présence du récepteur de l'activateur du récepteur NF- κ B (RANK) présent à la surface membranaire des précurseurs et des ostéoclastes matures (Myers *et al.* 1999 ; Nakagawa *et al.* 1998). Le RANK est une protéine transmembranaire de type I qui contient 616 acides aminés et qui est composée d'un domaine extracellulaire N-terminal, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine cytoplasmique C-terminal (Anderson *et al.* 2000). L'importance de ce récepteur a été démontrée par l'arrêt de l'ostéoclastogenèse lorsque la forme soluble de RANK ou des inhibiteurs de ce récepteur étaient injectés à des souris (Nakagawa *et al.* 1998). De plus, il a été montré que les souris transgéniques sur-exprimant le RANK (la forme soluble) présentaient une baisse d'activité ostéoclastique résultant en une hausse de la densité osseuse (ostéopétrose) (Nakagawa *et al.* 1998). Enfin, l'analyse des os des souris déficientes en RANK a montré que ces souris ne présentaient pas d'ostéoclastes visibles à la surface de l'os et qu'elles étaient caractérisées par une formation excessive de matrice osseuse (ostéopétrose) causée par l'absence du processus de résorption (Kong *et al.* 1999).

Ainsi, sous l'influence du M-CSF et du RANKL, les précurseurs hématopoïétiques vont proliférer, puis fusionner pour finalement devenir de très larges cellules multinucléées qui sont alors appelées ostéoclastes. Une fois formées, ces cellules migrent ensuite vers les sites de résorption à la surface de l'os, où la membrane plasmique des ostéoclastes s'attache à la matrice osseuse de manière à former une zone scellée de l'environnement externe (Vaananen *et al.* 1995). Une fois accrochés, les ostéoclastes vont produire et sécréter des vésicules acides dans le microenvironnement scellé à la surface de l'os. Ainsi, cet acide qui est relâché dans l'espace de résorption assure la dissolution des cristaux hydroxyapatites (Palokangas *et al.* 1997). Suite à la dissolution de la phase minérale de l'os, de nombreuses enzymes protéolytiques sont libérées afin de dégrader la matrice organique de l'os (le

collagène). L'une des enzymes importantes qui est affectée à la dégradation de la matrice osseuse est la cathepsine K, puisque l'inhibition de son activité par des inhibiteurs ou l'inhibition de l'activité du gène responsable de son expression chez la souris mène à l'accumulation de molécules de collagène non digérées dans les zones de résorption (Bossard *et al.* 1996 ; Saftig *et al.* 1998 ; Votta *et al.* 1997). Ce phénomène est également retrouvé dans les biopsies de patients présentant une mutation dans le gène codant pour la cathepsine K (Gelb *et al.* 1996). Ainsi, l'inhibition de cet enzyme n'empêche pas l'initiation de la résorption, mais prévient la dégradation du collagène. Pour continuer la résorption, les ostéoclastes incorporent les produits de dégradation par l'intermédiaire de vésicules qui sont ensuite sécrétées dans l'espace extracellulaire (Mulari *et al.* 2003). Suite à ce travail d'excavation, les ostéoclastes retournent vraisemblablement à un état inactif, puisqu'il a été démontré *in vitro* que ces cellules peuvent avoir plusieurs cycles de résorption (Kanehisa *et al.* 1990). Par contre, l'étude morphologique de biopsies osseuses révèle également la présence d'ostéoclastes morts par apoptose (Kanehisa *et al.* 1990).

2.2. Les ostéoblastes :

Les ostéoblastes sont également des cellules très spécialisées qui ont pour fonction principale d'assurer la formation de l'os et ainsi de remplacer la matrice osseuse détruite par les ostéoclastes. Ces cellules dérivent de cellules mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse. Ces dernières sont pluripotentes étant donné leur capacité à former des tissus fibreux, adipeux, cartilagineux et osseux (Pittenger *et al.* 1999). Sous l'influence de différents facteurs ou mécanismes encore peu connus, ces cellules vont se différencier en ostéoprogéniteurs, qui sont des cellules commises et restreintes à devenir d'abord des préostéoblastes. Ces derniers constituent une étape transitoire avant d'atteindre le stade d'ostéoblaste mature (Aubin *et al.* 1996). Ainsi, durant ce développement ostéoblastique, les cellules exprimeront progressivement les différents marqueurs phénotypiques des ostéoblastes, tels que la phosphatase alcaline

ainsi qu'un ensemble de protéines collagèneuses et non-collagèneuses (Aubin *et al.* 1996). Suite à leur différenciation à partir de leurs précurseurs, les ostéoblastes se retrouvent à la surface de l'os et commencent alors à sécréter différentes protéines formant l'ostéoïde qui constitue la matrice osseuse non-minéralisée (Gehron *et al.* 2002). Cette dernière est composée à 90% de collagène de type I qui assure la formation d'une structure sur laquelle les minéraux peuvent se déposer. L'ostéoïde contient également des protéines non collagèneuses tels que des protéoglycans ainsi que des glycoprotéines comme l'ostéonectine, la fibronectine, l'ostéopontine et la sialoprotéine de l'os. Ces dernières seraient impliquées dans l'adhésion des ostéoclastes et des ostéoblastes à l'os (Gehron *et al.* 2002). Enfin, les ostéoblastes présents à la surface de l'os sécrètent aussi de l'ostéocalcine qui préviendrait une minéralisation excessive (Aubin *et al.* 1996). Afin d'accomplir cette fonction de sécrétion de cette mixture complexe de protéines matricielles, les ostéoblastes ont un complexe de Golgi proéminent et beaucoup de réticulum endoplasmique rugueux (Prele *et al.* 2003). Suite à la sécrétion de ces différents composants qui constituent l'ostéoïde, certains ostéoblastes vont entrer en apoptose (Landry *et al.* 1997). D'ailleurs des études histologiques ont montré la présence d'ostéoblastes apoptotiques à la surface osseuse. Cependant, d'autres ostéoblastes deviennent emprisonnés dans l'ostéoïde qui s'est formé et sont alors appelés ostéocytes (Baud *et al.* 1968). Les nouveaux ostéocytes maintiennent un contact direct avec les ostéoblastes se trouvant au-dessus et aussi avec les générations antérieures d'ostéocytes. Ainsi, dans l'os mature un réseau d'ostéocytes interconnectés par des jonctions gap forme alors un syncytium fonctionnel (Aarden *et al.* 1994 ; Knothe *et al.* 2003). Bien que les ostéocytes aient une moins grande capacité de sécrétion comparativement aux ostéoblastes matures, ils conservent tout de même l'habileté de produire les différentes protéines matricielles, ceci probablement en vue de maintenir une zone tampon qui assure leur intégrité (Dudley *et al.* 1961). La survie de ces cellules semble être importante pour l'os, puisque la mort de ces cellules entraîne la résorption osseuse (Junqueira *et al.* 1995). De plus, il a été démontré que les

ostéocytes sont des mécanos senseurs pouvant percevoir les stress mécaniques (Burger *et al.* 1999). Ainsi, les ostéocytes permettraient à l'os de reconnaître et de répondre à différents stimuli en vue d'une adaptation fonctionnelle de ce dernier.

Le rôle des ostéoblastes dans la formation de la matrice osseuse ne se limite pas seulement à la sécrétion de la composante organique qui constitue l'os, puisque ces cellules sont également impliquées dans l'initiation de la minéralisation de l'ostéoïde. En effet, il a été démontré que les ostéoblastes libèrent des vésicules matricielles responsables de l'ossification embryonnaire et de la formation d'os chez l'adulte (Anderson 2003 ; Hoshi *et al.* 2000). Ces vésicules matricielles créent un environnement spécifique qui permet la formation de complexes de minéraux et de cristaux d'hydroxyapatite qui se déposent sur la membrane des vésicules. Par la suite, les cristaux se détachent des vésicules et servent ensuite de point de départ pour la calcification du tissu, qui demeure dans son ensemble un processus encore peu compris (Anderson 2003). Enfin, les ostéoblastes participent également au processus de minéralisation de l'os par la production d'une enzyme appelée phosphatase alcaline. Cette dernière assurant la disponibilité du phosphate qui est nécessaire pour la minéralisation (Fernley 1971). Ainsi, par son importance, la phosphatase alcaline est devenue un marqueur phénotypique de la différenciation ostéoblastique.

2.2.1. Régulation de la résorption osseuse par les ostéoblastes :

Bien que la fonction première des ostéoblastes soit d'assurer la formation de l'os, ces cellules sont maintenant également reconnues pour leur implication dans la régulation de l'ostéoclastogenèse et donc par le fait même dans la résorption osseuse. Récemment, une importante avancée dans la compréhension de ce nouveau rôle des ostéoblastes a été réalisée à l'aide d'un système murin utilisant une co-culture de précurseurs d'ostéoclastes et d'ostéoblastes ou de leurs précurseurs. Ainsi, ce système a permis de démontrer que la présence des ostéoblastes est absolument

requis pour générer des ostéoclastes fonctionnels (Chambers *et al.* 1993) ; cette action des ostéoblastes sur la différenciation des ostéoclastes se faisant par la sécrétion du M-CSF (Kodama *et al.* 1991 ; Lagasse et Weissman, 1997). Cependant, la sécrétion de ce facteur de croissance par les ostéoblastes n'est pas suffisante pour assurer le développement des ostéoclastes, puisque l'ajout de M-CSF soluble sans la présence des ostéoblastes n'est pas suffisant pour l'ostéoclastogénèse (Kodama *et al.* 1991) (Figure 1.2). Ceci suggère donc que d'autres facteurs produits par les ostéoblastes sont nécessaires. Par l'utilisation d'une membrane empêchant le contact entre les 2 types cellulaires mais perméable aux facteurs solubles, il a été démontré que le contact cellules-cellules était nécessaire pour l'induction de la formation des ostéoclastes (Chambers *et al.* 1993 ; Udagawa *et al.* 1989). Ainsi, ces résultats indiquent clairement la nécessité d'une interaction entre des molécules présentes à la surface membranaire des ostéoblastes et des ostéoclastes. Ces travaux ont donc mené à la découverte de la nécessité d'une interaction entre le RANKL qui est présent à la surface des ostéoblastes et de son récepteur RANK qui est exprimé à la membrane des ostéoclastes (Figure 1.2). Bien que l'on retrouve surtout le RANKL à la surface membranaire des ostéoblastes (Lacey *et al.* 1997 ; Yasuda *et al.* 1998), une forme clivée et sécrétée de cette protéine transmembranaire est également retrouvée (Kong *et al.* 1999 ; Nagai *et al.* 2000). D'ailleurs, il a été découvert que l'ajout d'un milieu conditionné en présence d'ostéoblastes pouvait induire la formation d'ostéoclastes ; ceci étant probablement causé par la présence de cette forme tronquée dans le milieu (Lum *et al.* 1999). L'importance de cette protéine dans l'ostéoclastogénèse a été démontrée par son administration à des souris. Ainsi, l'injection du RANKL à des souris induisait une hausse marquée de la formation et de l'activation des ostéoclastes, résultant même en une importante ostéoporose et en une hypercalcémie (Lacey *et al.* 1998). De plus, inversement, la perte d'expression du RANKL chez les souris mène à une inhibition de l'activité des ostéoclastes et par le fait même en une augmentation de la masse osseuse (Kong *et al.* 1999). Enfin, RANKL stimule également l'activation, la survie et l'adhérence à l'os des ostéoclastes (Burgess *et al.*

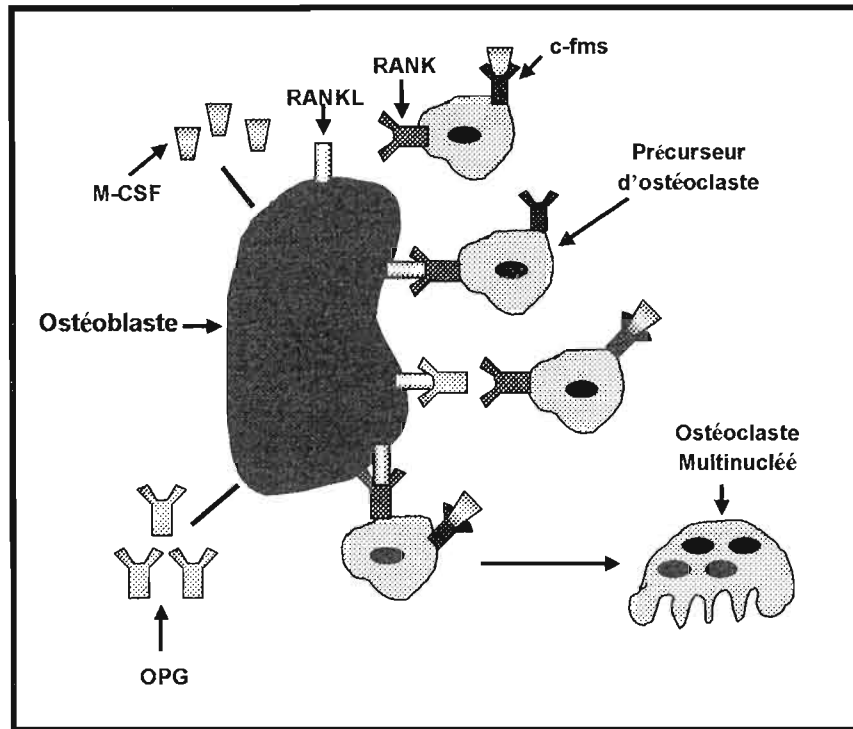


Figure 1.2 : Régulation de l'ostéoclastogenèse par les ostéoblastes : La présence des ostéoblastes est absolument requise pour que les ostéoclastes puissent proliférer et se différencier. Ainsi, pour assurer l'activité des ostéoclastes, les ostéoblastes sécrètent le M-CSF qui est un facteur de croissance nécessaire mais pas suffisant à l'activité des ostéoclastes. En plus du M-CSF, il a été découvert que l'interaction entre le RANK ligand (RANKL) et le RANK est requise pour l'activité des ostéoclastes. Le RANKL étant une protéine retrouvée à la surface des ostéoblastes et le RANK étant son récepteur qui se trouve sur les ostéoclastes. Ainsi, l'interaction entre ces deux protéines et la sécrétion de M-CSF par les ostéoblastes assurent l'ostéoclastogenèse. Les ostéoblastes régulent également l'activité des ostéoclastes en sécrétant l'ostéoprotégérine (OPG). Cette dernière constitue un ligand pour le RANKL et empêche donc l'interaction entre le RANKL et le RANK et donc par le fait même empêche l'ostéoclastogenèse.

1999 ; Lacey *et al.* 2000 ; O'Brien *et al.* 2000). Ainsi, l'ensemble de ces données indique toute l'importance des ostéoblastes dans le contrôle de la résorption osseuse.

Par la sécrétion de M-CSF et l'expression du RANKL à la membrane plasmique, les ostéoblastes participent donc activement à la régulation de l'activité des ostéoclastes. En plus de ces facteurs, les ostéoblastes synthétisent également l'ostéoprotégérine (OPG) en vue d'assurer la régulation de l'ostéoclastogenèse (Figure 1.2). L'OPG qui fut découverte en 1997 est une protéine sécrétée qui ne contient pas de domaine transmembranaire et qui est reconnue pour ses effets bénéfiques sur les os (Simonet *et al.* 1997 ; Tsuda *et al.* 1997). En fait, il a été découvert que l'OPG favorise la formation osseuse, car cette protéine sécrétée constitue un ligand pour le RANKL (Lacey *et al.* 1997 manquant ; Yasuda *et al.* 1998). Ainsi, sa présence empêche la formation des ostéoclastes en inhibant la liaison du RANKL aux RANK situés sur les ostéoclastes. Les effets de l'OPG sont donc opposés à ceux du RANKL et impliquent notamment l'inhibition de la différenciation, de la survie et de la fusion des précurseurs des ostéoclastes. De plus, l'OPG cause aussi la suppression de l'activation des ostéoclastes ainsi que l'apoptose de ces cellules spécialisées. Ces actions de l'OPG ont notamment été démontrées par l'inhibition de la formation des ostéoclastes, lorsque cette protéine était ajoutée à des co-cultures de précurseurs d'ostéoclastes et d'ostéoblastes (Akatsu *et al.* 1998 ; Udagawa *et al.* 2000). De plus, afin de favoriser la formation osseuse, il a été découvert que les niveaux d'OPG sont élevés durant l'embryogenèse (Simonet *et al.* 1997). Cependant, le rôle physiologique de l'OPG a été révélé par l'utilisation et l'étude de différents modèles de souris transgéniques. Ainsi, les souris sur-exprimant l'OPG ont une hausse de la masse et de la densité osseuse et ces effets sont en corrélation avec les niveaux d'OPG (Kong *et al.* 1999). Des résultats similaires sont également obtenus lorsque des souris normales reçoivent des injections d'OPG (Morony *et al.* 1999). De plus, les souris déficientes en OPG manifestent une sévère ostéoporose causée par une

activité trop élevée des ostéoclastes (Bucay *et al.* 1998). Ainsi, le RANKL et l'OPG qui sont produits par les ostéoblastes jouent un rôle primordial dans le remodelage osseux et le ratio RANKL/OPG détermine par le fait même la formation et l'activation des ostéoclastes. Enfin, il faut noter que de nombreuses cytokines et hormones ostéotropiques régulent ces protéines ostéoblastiques responsables de l'ostéoclastogenèse (Schoppet *et al.* 2002). Ainsi, l'ensemble de ces données indique clairement que le remodelage osseux implique une grande coordination entre les processus de résorption et de formation osseuse et qu'ainsi les ostéoblastes jouent un rôle majeur dans cette coordination.

Les ostéoblastes jouent donc un rôle de premier plan dans le métabolisme osseux, et cela autant en assurant la formation de nouveau tissu osseux qu'en régulant la résorption osseuse. La compréhension des facteurs qui peuvent affecter le métabolisme des ostéoblastes est donc primordiale pour l'élaboration de traitements de différentes pathologies affectant les os ainsi que pour la prévention de ces maladies. L'un de ces facteurs qui est impliqués dans le métabolisme des cellules ostéoblastiques sont les lipoprotéines. En effet, certaines études ont rapporté que ces particules assurent l'acheminement de différents lipides et vitamines nécessaires aux ostéoblastes et ainsi à l'intégrité du tissu osseux. De plus, il a aussi été suggéré que ces lipoprotéines peuvent, lors de conditions athérogéniques, induire le développement de l'ostéoporose. Ainsi, le présent projet vise à déterminer si le métabolisme des lipoprotéines par les ostéoblastes peut influencer les fonctions de ces derniers.

3. Les lipoprotéines :

Une lipoprotéine est une particule de lipides et de protéines, assemblée par des forces non-covalente, et retrouvée dans le plasma sanguin. La structure générale de ce complexe consiste en un noyau de lipides neutres composé de triglycérides (TG) et

d'esters de cholestérol (EC) qui sont présents en quantité variable selon le type de la lipoprotéine. Ce noyau hydrophobe se trouve enveloppé d'une monocouche lipidique amphipatique composée de phospholipides (PL) et de cholestérol libre (CL) ainsi que de protéines appelées apolipoprotéines (apo) (Scanu et Landsberger 1980). Ces dernières possèdent des régions hydrophobes et hydrophiles qui leur permettent d'interagir avec les lipides des lipoprotéines et avec l'environnement aqueux (Segrest *et al.* 1974). La présence de ces particules (les lipoprotéines) au niveau du plasma est due au fait que les TG et EC sont des molécules non-polaires et donc par conséquent insolubles dans les systèmes aqueux. Ainsi, la formation de ces macromolécules spécialisées, les lipoprotéines, permet d'assurer le transport et la distribution des lipides à travers le corps (Vance et Vance 1993). Le cholestérol acheminé aux cellules servira alors, selon le type cellulaire et ses fonctions, de précurseur à la synthèse d'hormones stéroïdiennes, d'acides biliaires et de vitamine D₃ (Nigon *et al.* 1991), et comme constituant de la membrane plasmique où il régule la fluidité. Quant à eux, les phospholipides transportés par les lipoprotéines peuvent devenir principalement des constituants de la membrane plasmique (Chapman *et al.* 1988).

La distinction des différentes classes de lipoprotéines repose essentiellement sur la proportion relative de lipides, le ratio protéines/lipides ainsi que sur les types d'apolipoprotéines qui sont présentes dans le complexe. Ces divers paramètres caractérisent la taille et la densité, et permettent de regrouper les lipoprotéines en classes bien définies (Gotto *et al.* 1986).

Les macromolécules lipoprotéiques les plus grosses retrouvées dans le plasma sanguin sont les chylomicrons qui possèdent une densité relative de 0,95 g/ml. Ceux-ci sont synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique des cellules du petit intestin et sont sécrétés dans le sang par exocytose (Havel et Hamilton 1988 ; Kane 1983). La fonction des chylomicrons est de transporter les TG et le cholestérol de la diète à partir des sites d'absorption (petit intestin) vers les cellules du corps. Ainsi, ces

lipoprotéines sont principalement retrouvées dans le plasma post-prandial. Une fois dans la circulation, les chylomicrons sont métabolisés par la lipoprotéine lipase (LPL) à la surface des cellules endothéliales de différents tissus extra-hépatiques (Havel 1986 ; Mahley *et al.* 1984). La LPL catalyse alors l'hydrolyse de la plupart des TG des chylomicrons, ce qui mène à la formation de résidus de chylomicrons. Ces derniers sont par la suite captés au niveau hépatique par le récepteur des LDL (rLDL) ainsi que par le récepteur des résidus de chylomicrons (Havel 1986 ; Windler *et al.* 1980), maintenant connu sous le nom de protéine apparentée au rLDL, soit la LRP. Il est intéressant de noter que des études récentes ont démontré que ce récepteur est exprimé par les cellules ostéoblastiques et qu'il permettrait d'internaliser les lipoprotéines riches en triglycérides transportant la vitamine K, un élément nécessaire à la modification post-traductionnelle de l'ostéocalcine (Newman *et al.* 2002 ; Niemeier *et al.* 2005).

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) possèdent une densité de 0,95-1,006 g/ml et sont surtout sécrétées par les hépatocytes (Hamilton 1972 ; Windmueller *et al.* 1973). Les VLDL sont de grosses particules, qui comme les chylomicrons, contiennent des TG à titre de constituant lipidique majeur. Elles ont comme fonction de redistribuer les acides gras sous forme de TG aux différents tissus du corps. En fait, l'hydrolyse des TG transportés dans le sang via les VLDL et les chylomicrons génère des acides gras qui sont utilisés comme source d'énergie par les différentes cellules. Cette hydrolyse des TG présents dans les VLDL est aussi effectuée par la LPL, ce qui entraîne la production de résidus de VLDL, aussi appelés lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL). Celles-ci peuvent ensuite interagir avec le rLDL hépatique (Windler *et al.* 1980) pour conduire à leur épuration de la circulation sanguine ou bien être métabolisées en lipoprotéines de faible densité (LDL) par l'action concertée de la LPL et de la lipase hépatique (Havel 1984 ; Sigurdsson *et al.* 1975).

Les LDL qui ont une densité de 1,019-1,063 g/ml sont des particules riches en EC et elles constituent, chez l'homme, les lipoprotéines majeures transportant le cholestérol. Les LDL sont retirées de la circulation sanguine via les rLDL (Brown *et al.* 1974) présents au niveau hépatique. De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il y a une corrélation positive entre les niveaux de LDL et les maladies cardio-vasculaires (Brown et Goldstein 1979).

La dernière classe de lipoprotéines répertoriée est celle des lipoprotéines de haute densité (HDL). Celles-ci originent du catabolisme des chylomicrons et des VLDL (Havel et Hamilton 1988) et elles peuvent aussi provenir d'une synthèse au niveau du foie et des intestins (Windmueller *et al.* 1973). Les HDL peuvent être subdivisées en 3 sous-classes, les HDL₁, HDL₂ et HDL₃, qui ensemble recouvrent une densité relative allant de 1,063 à 1,125 g/ml. Dans le présent projet, les HDL₃ seront utilisées, car elles ne contiennent pas d'apoE, ce qui permet de minimiser l'interaction de ces lipoprotéines avec des récepteurs moins spécifiques aux HDL, tel que le rLDL. Les HDL sont des particules riches en cholestérol qui sont impliquées dans le mécanisme de transport inverse du cholestérol (Eisenberg 1984). Ce mécanisme consiste à prendre le CL en excès des cellules des tissus périphériques, selon un processus désigné efflux de cholestérol, pour ensuite l'acheminer au foie en vue de l'excrétion et également aux tissus stéroïdogéniques (ovaires, testicules, glandes surrénales). Ainsi, la corrélation négative entre les niveaux de HDL plasmatiques et les maladies cardio-vasculaires (Miller et Miller 1975) serait attribuable à ce phénomène de transport inverse du cholestérol.

4. Métabolisme des lipoprotéines :

Tel qu'indiqué précédemment, les lipoprotéines en circulation permettent d'acheminer le cholestérol aux cellules de l'organisme pour son bon fonctionnement. Ainsi, à la surface des cellules, on retrouve différents récepteurs aux lipoprotéines qui

assurent la prise de ces dernières en vue de leur métabolisme éventuel. Cette prise des lipoprotéines se fait par différents processus (captation globale ou sélective) selon le récepteur qui est impliqué.

4.1.Captation globale des lipoprotéines natives :

La captation globale consiste en la prise de la particule lipoprotéique en entier et mène à sa dégradation complète par la cellule. Cette voie est essentiellement attribuée au rLDL qui fut originellement découvert par des études faites sur des cultures de fibroblastes humains (Brown *et al.* 1974) et qui fut subséquemment trouvé dans plusieurs autres cellules animales comme les hépatocytes. En fait, la majorité des rLDL exprimés dans le corps est retrouvée à la surface des cellules hépatiques (Krieger 1998). Le rLDL constitue le récepteur qui a été le plus étudié et le mieux caractérisé. Ainsi, il a été découvert que ce récepteur est une protéine transmembranaire de 860 acides aminés qui présente une masse de 160 kDa et qui contient cinq régions fonctionnelles distinctes. Le rLDL est composé d'un domaine cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et d'une région extracellulaire. À l'intérieur de cette dernière on retrouve un domaine glycosylé, un domaine présentant une homologie avec le récepteur du facteur de croissance épidermique et enfin un domaine riche en cystéines qui permet la liaison de l'apoB-100 et l'apoE (Schneider *et al.* 1982); cette dernière ayant une plus grande affinité que l'apoB-100 pour la liaison au rLDL (Windler *et al.* 1980). On a aussi découvert que le rLDL est situé dans des invaginations de la membrane qui sont riches en clathrines (Anderson *et al.* 1977). Il en résulte que la LDL en circulation se lie au rLDL retrouvé dans ces puits de clathrines par l'intermédiaire de l'apoB-100 de la lipoprotéine. Ensuite, la LDL et son récepteur sont internalisés dans une vésicule par endocytose. L'acidification de l'endosome résultant provoque la libération du récepteur et des protéines clathrines qui sont retournés à la surface cellulaire avant la fusion de l'endosome avec les lysosomes. Au niveau des lysosomes, l'apoB des LDL est dégradée en acides aminés

et les EC sont hydrolysés en CL et en acide gras. Ce CL fraîchement arrivé agira de manière à réduire le nombre de rLDL à la surface de la cellule afin de réduire la prise de LDL. De plus, cette arrivée de cholestérol aura pour effet de réguler à la baisse l'expression du gène de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase qui est l'enzyme clé dans la synthèse du cholestérol. Cette régulation des niveaux de cholestérol intracellulaire provient de la modulation de l'activité de la protéine liant les éléments de réponse aux stérols (SREBP). La SREBP est un facteur de transcription qui est retrouvée sous forme inactive au niveau du réticulum endoplasmique (RE). À cet endroit, lorsque les niveaux de cholestérol cellulaire sont élevés, on la retrouve associée avec la protéine activant le clivage de la SREBP (SCAP) ainsi qu'avec la protéine de rétention du RE (Insig) (Yang *et al.* 2002). Par contre, lorsqu'il y a une baisse du cholestérol cellulaire, il se produit un changement de conformation au niveau de la SCAP, ce qui entraîne la dissociation de l'Insig et permet le passage du complexe SREBP-SCAP vers l'appareil de golgi (Brown *et al.* 2002). Les protéases présentes dans ce dernier compartiment entraînent la libération de la forme transcriptionnelle active de la SREBP qui passera au noyau pour activer les différents gènes cibles.

L'importance du rLDL est bien illustrée par les désordres génétiques d'hypercholestérolémie familiale (HF), ou chez les lapins de Watanabe (WHHL), qui résultent en l'absence du récepteur en question. Dans ces cas, on constate une hausse marquée des niveaux sanguins de LDL, ce qui résulte éventuellement en une athérosclérose prématurée qui se caractérise, initialement, par l'apparition d'une lésion au niveau des parois des artères, et qui se poursuit par l'accumulation de dépôts lipidiques qui bloquent finalement le vaisseau sanguin affecté. Par contre, malgré l'importance des rLDL dans le catabolisme des LDL, il a été déterminé chez les rats et les humains que seulement deux tiers de la clairance des EC associés aux LDL se fait via le rLDL (Dietschy *et al.* 1993). Ainsi, tout semble indiquer qu'il y aurait une autre voie permettant la clairance des LDL ou du moins de ses molécules de

cholestérol. Des études faites sur des cellules HepG2 (modèle de cellules hépatiques) exprimant des niveaux de rLDL réduits, montrent que celles-ci lient et prennent les LDL à un même taux que les cellules HepG2 normales, mais on constate que ces cellules dégradent moins l'apoB des LDL (Izem *et al.* 1998). Ceci laisse entrevoir que le processus de captation sélective pourrait aussi être impliqué dans la clairance des EC des LDL. Enfin, il est également intéressant de noter que les cellules ostéoblastiques expriment le rLDL (Niemeier *et al.* 2005). Bien que la fonction précise de ce récepteur au niveau des cellules osseuses n'ait pas encore été identifiée, cela laisse entrevoir que les lipoprotéines sont nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme osseux.

À l'opposé des LDL, la captation globale des HDL demeure un phénomène encore peu connu et cela malgré le fait qu'il a été démontré que les reins et le foie sont en mesure de cataboliser les HDL (Hammad *et al.* 1999). Cette prise des HDL a été attribuée à l'activité du récepteur cubiline qui est une protéine de 460 kDa exprimée au niveau des cellules épithéliales du rein, des intestins et du placenta (Sahali *et al.* 1992 ; Seetharam *et al.* 1997). Ainsi, il a été démontré qu'un anticorps bloquant ce récepteur inhibe l'endocytose des HDL au niveau de cellules provenant de placenta de souris (Hammad *et al.* 1999 ; Kozyraki *et al.* 1999). Cette inhibition de l'endocytose résulte également en une diminution de la dégradation des HDL (Hammad *et al.* 1999). Enfin, il a été démontré que seul, le récepteur cubiline ne peut assurer l'internalisation des HDL. Ainsi, pour y arriver, il doit y avoir une interaction entre le cubiline et le récepteur mégaline aussi appelé récepteur apparenté au rLDL (LRP-2). En effet, il a été démontré que l'utilisation d'anticorps bloquant le LRP-2 inhibe la prise dépendante du récepteur cubiline (Hammad *et al.* 2000).

4.2.Captation sélective des EC des lipoprotéines natives:

La captation sélective est un phénomène qui implique la prise d'EC à partir de la lipoprotéine liée à la cellule, sans que la particule lipoprotéique entière soit dégradée

par la cellule. Bien que ce phénomène de captation sélective fut pendant plusieurs décennies attribué exclusivement aux HDL (Knecht *et al.* 1989), il a été démontré qu'il s'exerce aussi sur les IDL (Brissette et Falstrault 1994) et les LDL (Brissette *et al.* 1996). Une étude comparative de l'efficacité de captation sélective des EC envers les différentes classes de lipoprotéines a révélé une corrélation négative entre cette efficacité et le ratio lipides/protéines des différentes classes de lipoprotéines (Brissette *et al.* 1996). Ainsi, on retrouve en ordre croissant de donneurs en EC, les VLDL, IDL, LDL et les HDL.

4.2.1. Le récepteur scavenger de classe B et de type 1 (SR-BI) :

Ce processus de captation sélective est généralement attribué au récepteur *scavenger* de classe B et de type I (SR-BI). Le SR-BI est une glycoprotéine monomérique de 85 kDa constituée de 509 acides aminés, et ayant, sous sa forme non glycosylée, un poids moléculaire apparent de 57 kDa qui fut découverte, chez les rongeurs, en 1994 par le groupe de Krieger (Acton *et al.* 1994). Toutefois, suite à cette découverte, on s'aperçut que le gène du SR-BI avait déjà été cloné en 1993, par le groupe de Vega, chez l'homme (Calvo et Vega 1993) et identifié sous le nom de « CD36 and LIMPII Analogous-1 » (CLA-1). Ainsi, deux nomenclatures s'appliquent pour ce récepteur, mais ici nous utiliserons seulement le terme SR-BI. Ce récepteur membranaire présente une forme en « U » inversé et possède deux domaines intracellulaires séparés par un large domaine extracellulaire (Calvo *et al.* 1997). Le SR-BI est retrouvé à la membrane plasmique dans des domaines nommés radeaux lipidiques qui se caractérisent par une composition riche en sphingolipides et en cholestérol. Plus précisément, il a été découvert que le SR-BI se retrouve dans des invaginations de la membrane appelées cavéoles (Babitt *et al.* 1997 ; Lisanti *et al.* 1994 ; Matveev *et al.* 1999). Celles-ci sont des domaines membranaires également riches en sphingolipides et en cholestérol, mais qui se distinguent des radeaux lipidiques par la présence de protéines de la famille des cavéolines. Les cavéoles sont donc considérées comme un type spécialisé de radeaux lipidiques. Toutefois, il est important de mentionner que la

présence des cavéoles n'est pas un pré-requis pour l'expression du SR-BI, puisque différentes études ont montré la présence membranaire de ce récepteur dans des cellules dépourvues de cavéolines et par conséquent de cavéoles (cellules granulaires ovariennes et HepG2) (Azhar *et al.* 1998 ; Reaven *et al.* 1999 ; Rhainds *et al.* 2004). Ainsi, en absence de ce domaine cavéolaire, il a été démontré que le SR-BI est retrouvé dans des domaines de la surface cellulaire ayant une faible densité et correspondant aux radeaux lipidiques.

Le SR-BI est en mesure de lier les lipoprotéines modifiées telles les LDL oxydées et les LDL acétylées (Gu *et al.* 1998). Il reconnaît également avec une grande affinité les LDL (Acton *et al.* 1996), les HDL (Acton *et al.* 1996) et les VLDL naissantes (Calvo *et al.* 1997), ainsi que l'apoA-I, l'ApoA-II et l'ApoC-III (Xu *et al.* 1997). Enfin, il a la capacité de reconnaître l'albumine maléylée (BSA-M) et les phospholipides anioniques (Rigotti *et al.* 1995). Chez les rongeurs (Acton *et al.* 1994 ; Landschulz *et al.* 1996) et les humains (Liu *et al.* 2002), il est surtout exprimé au niveau hépatique ainsi que dans les tissus stéroïdogéniques tels les ovaires, les testicules et les glandes surrénales. Ce profil d'expression du SR-BI est cohérent avec la fonction de prise sélective d'EC dans les tissus stéroïdogéniques et dans le foie qui est attribuée à ce récepteur (Acton *et al.* 1996). Donc, il y aurait corrélation entre l'expression du SR-BI et la captation sélective.

Le mécanisme détaillé par lequel le SR-BI effectue cette prise sélective d'EC à partir des lipoprotéines demeure passablement obscur. Jusqu'à tout dernièrement, l'hypothèse la plus répandue suggérait la formation d'un canal hydrophobe permettant le transfert des EC (Knecht et Pittman 1989). Plus récemment cette hypothèse a été appuyée par la démonstration que des protéines membranaires purifiées et reconstituées en liposomes, soit sans machinerie cellulaire, démontrent une activité de captation sélective (Liu *et al.* 2002). Cependant, une autre étude faite par le groupe de Tall (Silver *et al.* 2001) a plutôt révélé qu'au niveau de cultures

primaires d'hépatocytes de souris, la lipoprotéine est internalisée suite à sa liaison au récepteur. Une fois internalisée, une partie du cholestérol de la lipoprotéine subit une transcytose sélective et est ainsi transportée vers la membrane apicale, alors que la lipoprotéine subit une rétro-endocytose vers la membrane basolatérale pour être re-sécrétée dans la circulation. Les travaux effectués par le groupe de madame Brissette supportent ce mécanisme au niveau des cellules HepG2 (Rhainds *et al.* 2004). Bien que ce phénomène semble être présent au niveau des cellules hépatiques, aucun résultat clair ne permet d'appliquer ce phénomène de rétro-endocytose à tous les types cellulaires, ce qui pourrait expliquer la divergence existant dans la littérature.

Il existe un récepteur très similaire au SR-BI qui fut nommé SR-BII. En fait, ce récepteur provient d'un épissage alternatif de l'ARNm du SR-BI. Ainsi, la séquence du SR-BII est en tout point identique à celle du SR-BI, à la seule distinction qu'il possède une queue cytoplasmique plus courte. Cependant, malgré cette grande similarité entre ces deux formes, le SR-BII ne représente, au foie, que 12% de l'ensemble des SR-B générés à partir du gène *SR-BI*. De plus, il a été établi que le SR-BII est 4 fois moins efficace que le SR-BI à prendre sélectivement les EC à partir des HDL (Webb *et al.* 1997 ; Webb *et al.* 1998). Ainsi, le rôle du SR-BII demeure encore inconnu.

4.2.1.1. Régulation de l'expression du SR-BI :

L'expression du gène du SR-BI peut être régulée par différents facteurs dont la diète. Ainsi, il a été constaté que chez les hamsters, une diète riche en acides gras polyinsaturés stimulait l'expression du gène au niveau hépatique (Spady *et al.* 1999). À l'opposé, une diète contenant de l'acide myristique provoque une baisse des niveaux du SR-BI qui entraîne une hausse des niveaux de HDL plasmatiques chez les hamsters (Loison *et al.* 2002). Il est donc évident que la diète a un impact sur l'expression du SR-BI et que cet effet se répercute sur la clairance du cholestérol des HDL. Les hormones en circulation sont un autre facteur pouvant affecter

l'expression du SR-BI au foie. En effet, des hamsters diabétiques traités avec de l'insuline ont une baisse de l'expression du SR-BI lorsqu'on compare ces hamsters avec d'autres ayant été traités avec de la saline ou bien étant des hamsters normaux non diabétiques (Dubrac *et al.* 2001). L'estrogène est une autre hormone qui semble avoir un impact sur le niveau d'expression du gène. En effet, il a été démontré que l'administration de cette hormone à des doses pharmacologiques supprime toute expression du SR-BI au foie (Landschultz *et al.* 1996). Cependant, il est intéressant de noter qu'en parallèle à cette baisse, il y a une augmentation de l'expression du SR-BII (Graf *et al.* 2001). Les niveaux d'oestrogène en circulation pourraient donc expliquer les différences dans les niveaux d'expression du SR-BI que l'on retrouve selon le sexe de l'animal. En effet, il est connu que chez les rats, les femelles ont moins de SR-BI hépatique que les mâles. Par contre, le retrait des ovaires donne une expression hépatique du SR-BI qui est équivalente à celle que l'on retrouve chez les mâles (Graf *et al.* 2001). À l'opposé de l'oestrogène, la testostérone entraîne une augmentation de l'expression du SR-BI dans les hépatocytes. En effet, il a été démontré que des cellules HepG2 traitées avec de la testostérone expriment davantage de SR-BI (Langer *et al.* 2002).

4.2.1.2.Implication physiologique du SR-BI dans le métabolisme des HDL :

Le phénomène de la captation sélective des EC des HDL a tout d'abord été démontré en 1996 par le groupe de Krieger (Acton *et al.* 1996) qui, par l'utilisation de cellules sur-exprimant le SR-BI, a constaté que ce dernier est effectivement responsable de la captation sélective des EC présents au niveau des HDL. Par la suite, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré la participation de ce récepteur dans le mécanisme de prise sélective du cholestérol provenant des HDL (Babitt *et al.* 1997 ; Rigotti *et al.* 1997 ; Ueda *et al.* 1999 ; Varban *et al.* 1998). En fait, récemment, 3 études simultanées ont démontré que le SR-BI était le seul récepteur physiologique responsable de la captation sélective des EC des HDL (Brodeur *et al.* 2005 ; Brundert

et al. 2005 ; Out, Hoekstra *et al.* 2004). Une de ces études relève de ma contribution (Brodeur *et al.* 2005).

4.2.1.3.Implication du SR-BI dans le métabolisme des LDL :

La captation sélective des EC des LDL a très peu été abordée. Au niveau des cultures primaires, la captation sélective des EC provenant des LDL a été démontrée dans certaines lignées cellulaires. Ainsi, les cellules hépatiques de rats, les fibroblastes humains (Green *et al.* 1991), les hépatocytes de souris (Truong *et al.* 2000) et les cellules HepG2 (Rinninger *et al.* 1993 ; Brissette *et al.* 1996) sont toutes en mesure d'effectuer le processus de la captation sélective à partir des LDL. Quelques études *in vitro* ont par la suite démontré que la sur-expression du SR-BI permettait aux cellules COS-7 (Swarnakar *et al.* 1999) et CHO (Stangl *et al.* 1998) de prendre sélectivement des EC provenant des LDL. Des travaux du laboratoire de madame Brissette avec des cellules HepG2 dont l'expression du SR-BI était réduite de 75% par l'expression constitutive d'ARN antisens au mARN de SR-BI a démontré une implication de 85% de SR-BI dans la captation sélective des EC des LDL (Rhainds *et al.* 2003). Des souris transgéniques sur-exprimant le SR-BI hépatique ont des LDL/IDL ayant une taille réduite, ce qui est un résultat cohérent avec le retrait sélectif d'EC des LDL par le SR-BI (Kozarsky *et al.* 1997 ; Wang *et al.* 1998). Des souris à moitié (hétérozygotes) ou complètement (homozygotes) déficientes en rLDL et sur-exprimant le SR-BI, ont des niveaux réduits de cholestérol présent dans la fraction des VLDL et des LDL, lorsqu'elles sont nourrit avec une diète riche en acides gras et en cholestérol (Ueda *et al.* 1999 ; Wang *et al.* 1998). Une étude similaire a montré que les souris transgéniques en apoB et sur-exprimant le SR-BI vont éliminer légèrement plus rapidement les EC des LDL alors que la clairance de la partie protéique n'est pas modifiée (Webb *et al.* 2002). Enfin, le groupe de madame Brissette a récemment montré *in vivo* par l'utilisation de souris déficientes en SR-BI que ce dernier est en mesure de prendre sélectivement les EC des LDL, mais qu'il

existe un mécanisme permettant de compenser pour l'absence du SR-BI (Brodeur *et al.* 2005).

4.2.2. Le cluster of differentiation 36 (CD36) :

Le CD36 est un autre récepteur qui est également en mesure de prendre sélectivement les EC à partir des LDL et des HDL. Le CD36 est une glycoprotéine de surface cellulaire de 88 kDa composée de 471 acides aminés qui a été découverte en 1976 (Endemann *et al.* 1993). Ce récepteur est connu comme étant une protéine en mesure de lier et de transporter les acides gras à longue chaîne au niveau des adipocytes (Abumrad *et al.* 1993). Son expression au niveau des macrophages (Tall *et al.* 1983), des plaquettes (Li *et al.* 1993), des cellules endothéliales microvasculaires (Greenwalt *et al.* 1992) et des tissus adipeux (Abumrad *et al.* 1993) contraste avec la prédominance hépatique et stéroïdienne de l'expression du SR-BI. Par contre, on le détecte aussi au niveau des cellules hépatiques (Maeno *et al.* 1994). Le CD36 est en mesure de reconnaître une grande variété de ligands qui inclut les phospholipides anioniques (Rigotti *et al.* 1995), les cellules apoptotiques (Ren *et al.* 1995) et les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Oquendo *et al.* 1989). Le CD36 présente une forme en « U » inversé et possède donc une large boucle extra-cellulaire et deux domaines intra-cellulaires. Il a été démontré que de manière similaire au SR-BI, le CD36 est présent dans les cavéoles de cellules musculaires lisses (Vistisen *et al.* 2004) et d'adipocytes (Souto *et al.* 2003). Cependant, il apparaît que le CD36 peut aussi se retrouver dans d'autres compartiments de la membrane. En effet, il a été démontré à l'aide de cellules CHO sur-exprimant le CD36, que ce dernier est présent dans les radeaux lipidiques et non dans les cavéoles (Zeng *et al.* 2003). Ainsi, il est possible que la localisation cellulaire du CD36 diffère selon le type cellulaire.

4.2.2.1. Régulation de l'expression du CD36:

L'expression du gène de CD36 est sous le contrôle d'une multitude de facteurs, ce qui est en accord avec sa distribution cellulaire très vaste et ses nombreux rôles. Il a été

démontré que l'expression du CD36 augmente lorsque les monocytes se différencient en macrophages. De plus, cette hausse se manifeste lors d'une exposition des macrophages à différents facteurs de croissance, tels que le M-CSF et le facteur de croissance stimulant la colonie des macrophages (GM-CSF) (Huh *et al.* 1995 ; Huh *et al.* 1996 ; Yesner *et al.* 1996). En lien avec l'athérosclérose, il a aussi été montré que les LDL ayant été oxydées (LDLOx) causent une hausse de l'expression du CD36 au niveau des macrophages (Nagy *et al.* 1998 ; Tontonoz *et al.* 1998). Cette modulation de l'expression du CD36 est associée avec une hausse de l'activité du récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes gamma (PPAR γ). En effet, il a été montré que les LDLOx contiennent des lipides oxydés capables de lier et d'activer les PPAR γ (Nagy *et al.* 1998 ; Tontonoz *et al.* 1998). L'importance des PPAR γ dans la régulation du CD36 est également supportée par la démonstration que l'interleukine-4 augmente l'expression du CD36 par l'intermédiaire de ce facteur de transcription (Feng *et al.* 2000). De plus, il a été montré que le facteur de croissance tumoral (TGF) induit une baisse de l'expression du CD36 par l'inhibition de l'activité des PPAR γ au niveau des macrophages (Han *et al.* 2000). Ces études indiquent donc que les PPAR γ sont les facteurs de transcription clés dans la modulation de l'expression du CD36 au niveau des macrophages. Cette importance des PPAR γ dans l'expression du CD36 est également retrouvée au niveau d'autres types cellulaires, tels que les adipocytes (Sfeir *et al.* 1997) et les cellules musculaires lisses (Greenwalt *et al.* 1995).

4.2.2.2. Implication du CD36 dans le métabolisme des HDL :

Le CD36 possède l'habilité de lier les HDL avec une haute affinité, mais *in vitro* il est moins efficace que le SR-BI pour permettre la prise sélective des EC à partir de ces HDL (Gu *et al.* 1998 ; Connelly *et al.* 1999). Il n'existe toutefois pas d'évidence que cette captation sélective se produise *in vivo*. En effet, il a été démontré que la sur-expression hépatique du CD36 n'a aucun effet sur le profil des lipoprotéines et plus spécifiquement sur le niveau de cholestérol des HDL (de Villiers *et al.* 2001).

Cependant, le groupe de Febbraio a montré que les souris déficientes en CD36 ont des HDL légèrement enrichies en cholestérol (Febbraio *et al.* 1999). Toutefois, d'autres ont montré que la déficience en CD36 n'a pas d'effet sur le contenu lipidique des HDL (Goudriaan *et al.* 2003). De plus, dans une étude du groupe de madame Brisette (étude à laquelle j'ai contribué durant la réalisation de ce doctorat), il a été démontré que les HDL des souris déficientes en CD36 montrent plutôt une légère diminution au niveau de leur contenu en cholestérol (Luangrath *et al.* 2008). Ainsi, étant donné l'effet relativement faible de la déficience en CD36 sur le cholestérol des HDL (hausse ou baisse de 30%) et aussi les divergences, il est probable que les effets perçus ne soient que marginaux. Ainsi, à partir de ces données, on peut déduire que le CD36 n'a pas de fonction prédominante dans le métabolisme des HDL.

4.2.2.3. Implication du CD36 dans le métabolisme des LDL :

Le rôle du CD36 en tant que récepteur potentiel des LDL est aussi encore obscur. Il a été démontré que le CD36 murin lie très faiblement les LDL, ce qui suggère qu'il pourrait ne pas être impliqué dans le métabolisme des LDL (De Villiers *et al.* 2001). Par contre, le groupe de Vega (Calvo *et al.* 1998) a trouvé que les cellules mammaliennes COS-7 et les cellules Sf9 d'insectes, sur-exprimant le CD36 humain, ont une haute affinité pour les LDL. Il faut aussi noter qu'à ce jour, il y a peu d'études qui ont porté sur la captation sélective des EC de LDL par CD36. L'une de ces études a montré par l'utilisation de cellules COS sur-exprimant le SR-BI ou le CD36 que ces deux récepteurs sont également efficaces pour prendre sélectivement les EC des LDL (Connelly *et al.* 2003). Il a également été démontré par l'utilisation de souris déficientes en SR-BI et CD36 que ce dernier est en mesure de capter sélectivement les EC des LDL lorsque le SR-BI est absent (Luangrath, Brodeur (co-premiers auteurs) *et al.* 2008).

5.Implication des lipoprotéines dans le métabolisme osseux :

5.1.Rôle des lipoprotéines dans les fonctions ostéoblastiques :

Malgré le fait que l'importance du cholestérol au niveau du métabolisme osseux demeure encore très peu étudiée, il existe tout de même à ce jour quelques évidences de cette interaction. En effet, les lipoprotéines sont reconnues pour transporter différentes vitamines lipophiles qui sont nécessaires au métabolisme normal du tissu osseux. D'une part, il y a la vitamine E qui est principalement associée et transportée dans la circulation vers les différents tissus par les HDL. Cette classe de lipoprotéine pourrait par conséquent jouer un rôle majeur dans le métabolisme osseux étant donné qu'il a été démontré que cette vitamine a un effet bénéfique sur la formation et la réparation osseuse (Smith *et al.* 2004 ; Turk *et al.* 2004). Ainsi, on peut présentement présumer que les HDL assureraient l'acheminement de la vitamine E aux cellules du tissu osseux via les récepteurs à cette lipoprotéine.

La vitamine K constitue un autre exemple de l'importance des lipoprotéines dans l'acheminement de composés nécessaires au métabolisme osseux. En effet, différentes études ont établi un lien entre une déficience en vitamine K et une prédisposition à l'ostéoporose (Shearer 1997 ; Shearer 2000). Cette dernière vitamine est nécessaire comme cofacteur pour la conversion des résidus glutamyl (Glu) en carboxyglutamyl (Gla) de certaines protéines que l'on nomme protéine Gla, telles que l'ostéocalcine qui est retrouvée au niveau de l'os (Stenflo *et al.* 1974). La forme prédominante de la vitamine K dans la circulation est la phylloquinone (vitamine K1) (Shearer 1997). Cette dernière provient de la diète et est transportée en prédominance par les chylomicrons. De plus, à la différence des autres vitamines lipophiles, cette vitamine demeure associée en prédominance avec les lipoprotéines riches en triglycérides même lorsque l'individu est à jeun (Lamon-Fava *et al.* 1998). Étant donné l'ensemble de ces connaissances, différents groupes de recherche ont tenté de démontrer que la vitamine K était acheminée aux ostéoblastes par l'intermédiaire des

lipoprotéines riches en triglycérides, soit les résidus de chylomicrons. Ainsi, après avoir incorporé de la vitamine K marquée radio-activement à l'intérieur des chylomicrons, le groupe de Shearer a démontré que les ostéoblastes sont en mesure de prendre cette vitamine à partir des lipoprotéines (Newman *et al.* 2002), par un processus de captation globale de la particule lipoprotéique et non par un récepteur spécifique à la vitamine K. En effet, il a été démontré que cette prise se faisait par l'intermédiaire du récepteur des résidus de chylomicrons (Niemeier *et al.* 2005), maintenant connu sous le nom de LRP. Il a également été démontré que cette prise de la vitamine K était dépendante de l'apoE (Newman *et al.* 2002 ; Niemeier *et al.* 2005). En effet, l'ajout exogène de cette apolipoprotéine augmente la prise de la vitamine K associée aux résidus de chylomicrons. Ce rôle de l'apoE est aussi appuyé par la démonstration qu'un anticorps ciblant cette apo réduit de manière marquée la prise de la vitamine K par les ostéoblastes. Enfin, l'importance de l'apoE dans l'acheminement de cette vitamine aux ostéoblastes a également été démontrée par l'utilisation de souris déficientes en apoE. En effet, le groupe d'Amling a montré que ces souris présentaient une masse osseuse plus élevée que les souris contrôles (Schilling *et al.* 2004) ; cette augmentation étant causée par une hausse du taux de formation osseuse résultant d'une diminution de la prise de la vitamine K par les ostéoblastes des souris déficientes en apoE. Ainsi, la prise réduite de la vitamine K mène à une perte de la carboxylation de l'ostéocalcine qui est essentiel afin d'assurer l'inhibition de la formation osseuse.

En plus de leur rôle dans le transport des vitamines, les lipoprotéines pourraient également avoir la fonction de transporter et d'acheminer l'oestrogène aux différents tissus de l'organisme tels que l'os. Malgré le fait qu'il est reconnu que l'oestrogène est transportée par les globulines liant les hormones sexuelles (SHBG) (Hammond et Bocchinfuso 1995), il a été démontré que l'oestrogène est aussi retrouvée au niveau des lipoprotéines (Helisten *et al.* 2001 ; Leszczynski et Schafer 1990 ; Tang *et al.* 1997). En effet, suite à une incubation d'estradiol marquée radio-activement avec du

plasma, le groupe de Tikkanen a déterminé que l'estradiol se retrouvait principalement associée avec les HDL, mais aussi avec les LDL et en proportion faible avec les VLDL (Helisten *et al.* 2001). Il a également été démontré que l'estradiol associée aux lipoprotéines est en prédominance sous forme estérifiée (Helisten *et al.* 2001 ; Höckerstedt *et al.* 2004). Cette estérification de l'estradiol est attribuable à l'action de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) que l'on retrouve au niveau des HDL, puisque l'inhibition de cette enzyme empêche la production d'estradiol estérifiée et par conséquent son incorporation dans les HDL (Helisten *et al.* 2001). Ainsi, l'activité de la LCAT est essentielle pour que l'oestrogène s'associe aux HDL. Toutefois, la présence d'oestrogène au niveau des LDL s'explique par un processus distinct de ce qui a été découvert pour les HDL. En effet, la présence d'estradiol estérifiée au niveau des LDL nécessite l'action d'une autre enzyme, soit la protéine de transfert des EC (CETP) qui assure le transfert de l'estradiol incorporée dans les HDL vers les LDL (Helisten *et al.* 2001). La présence de l'oestrogène au niveau des lipoprotéines permet d'assurer différentes fonctions. D'une part, il a été démontré que la présence d'oestrogène augmente la résistance des LDL à l'oxydation (Shwaery *et al.* 1997 ; Shwaery *et al.* 1998). De plus, des études récentes ont démontré que l'estradiol associée aux HDL pouvait être transférée aux cellules. En effet, le groupe de Smart a montré que les HDL avaient la capacité de transférer l'estradiol leur étant associée aux cellules endothéliales humaines (Gong *et al.* 2003) par une captation sélective suite à la liaison des HDL aux SR-BI. Il a également été démontré que l'estradiol estérifiée était transférée par l'intermédiaire du SR-BI vers les hépatocytes et qu'une fois dans la cellule, l'estradiol estérifiée était hydrolysée pour ainsi devenir de l'estradiol libre (Badeau *et al.* 2007). Ainsi, sous cette forme libre, l'estradiol recouvre sa capacité de lier les récepteurs à l'estrogène. L'ensemble de ces données laisse donc envisager que les lipoprotéines pourraient jouer un rôle important dans l'intégrité du tissu osseux, de par leur capacité à transporter et potentiellement transférer l'oestrogène aux cellules osseuses. L'importance de déterminer les mécanismes permettant l'acheminement de

l'oestrogène aux tissus osseux est démontrée par une perte osseuse rapide et sévère lors d'une déficience en cette hormone (Bilezikian *et al.* 1998 ; Riggs *et al.* 1998). Cet effet protecteur de l'estrogène a principalement été attribué à un effet inhibiteur de cette hormone sur la résorption osseuse. En effet, il a été démontré que l'estrogène induit l'apoptose des ostéoclastes (Saintier *et al.* 2006). De plus, cette réduction de la dégradation de l'os induite par l'oestrogène a aussi été attribuée à la régulation de l'ostéoclastogenèse par les ostéoblastes. Effectivement, il a été rapporté que l'oestrogène cause une baisse de la production de cytokines ostéoclastogénique par les ostéoblastes et aussi une hausse des facteurs inhibant l'ostéoclastogenèse (Manolagas et Jilka 1995 ; Spelsberg *et al.* 1999 ; Saika *et al.* 2001). Enfin, il a également été rapporté que l'oestrogène peut favoriser directement la formation osseuse en agissant au niveau des ostéoblastes. En effet, il a été démontré que l'oestrogène induit une augmentation de la différenciation ostéoblastique (Dang *et al.* 2002). Cet effet ostéogénique est aussi retrouvé *in vivo*, puisque l'administration d'oestrogène a pour conséquence de favoriser la formation osseuse autant chez les rongeurs (Samuels *et al.* 1999) que chez l'humain (Bord *et al.* 2000).

5.2.Impact pathologique des lipoprotéines :

Tel que mentionné précédemment, les os constituent un tissu vivant composé d'une abondante matrice extracellulaire calcifiée qui est continuellement remodelée par l'intermédiaire des ostéoclastes et des ostéoblastes. Ainsi la perte de l'équilibre entre ces deux processus, par une réduction de l'activité ostéoblastique ou bien par la hausse de l'activité ostéoclastique mène à l'ostéoporose. Cette pathologie est caractérisée par une baisse de la densité minérale et de la masse osseuse, ce qui résulte en la génération d'os plus faibles et étant par le fait même plus susceptibles à subir des fractures. Bien que certains facteurs de risque aient été identifiés, tels que le statut hormonal, certains traitements médicaux et une immobilité prolongée, le développement de l'ostéoporose ne peut pas s'expliquer entièrement par ceux-ci et la présence de conditions athérogéniques, étant représentées par des niveaux élevés de

cholestérol plasmatique, constitue un facteur de risque additionnel récemment proposé. Une corrélation entre l'ostéoporose et l'athérosclérose a d'ailleurs été démontrée par des études épidémiologiques (Barengolts *et al.* 1998 ; Uyama *et al.* 1997) et génétiques (Shiraki *et al.* 1997) ainsi que par des études faites chez la souris (Parhami *et al.* 2001). De plus, il a été constaté que l'administration de produits modulant les niveaux de cholestérol (les statines et certains médicaments anti-épileptiques) affectait également le métabolisme osseux (Maeda *et al.* 2001 ; Sozuer *et al.* 1997 ; Staal *et al.* 2003). Enfin, il a aussi été démontré que dans les os ostéoporotiques, il y a présence d'une accumulation de lipides (Ramseier 1962). Cette corrélation entre ces deux pathologies suggère donc la présence de facteurs communs entraînant le développement de ces maladies. Étant donné que la progression des maladies cardiovasculaires est directement reliée au niveau des LDL en circulation (Brown et Goldstein 1979), et que ces lipoprotéines deviennent pro-athérogéniques suite à une modification oxydative, nous croyons que les LDL oxydées (LDLOx) seraient également responsables de l'ostéoporose. D'ailleurs, certaines études ont démontré que les LDLOx ont un impact autant sur la survie et la différenciation des cellules ostéoblastiques (Klein *et al.* 2003 ; Parhami *et al.* 1997). Cependant, l'effet que peuvent avoir les LDLOx sur les ostéoblastes demeure encore peu documenté, ainsi que les récepteurs ostéoblastiques pouvant permettre un effet potentiel des LDLOx.

6. Les LDL oxydées :

Il y a de plus en plus d'études qui suggèrent que les LDL modifiées par une oxydation sont impliquées dans le développement des lésions athérosclérotiques qui débutent par la formation de cellules spumeuses. Ces cellules contiennent des quantités élevées de cholestérol à l'intérieur de leur cytoplasme (Lougheed *et al.* 1999). Cette accumulation de cholestérol à l'intérieur des cellules provient de la prise de lipoprotéines qui ne sont pas des LDL natives (Goldstein *et al.* 1979). En effet, la captation des LDL natives, par les macrophages, ne peut mener à la formation de ces

cellules spumeuses puisque le niveau d'expression du rLDL est faible et qu'il est régulé à la baisse par la présence de cholestérol (Brown et Goldstein 1983). De plus, les patients et les animaux déficients en rLDL, présentent une accumulation de cholestérol dans les macrophages et une formation de cellules spumeuses d'une façon similaire à celle observée chez les patients ou les animaux possédant le récepteur actif (Basu *et al.* 1979). Il a donc été proposé que la formation des cellules spumeuses était induite par la prise de LDL ayant subies une modification chimique (Steinbrecher 1987). La modification des LDL la plus étudiée jusqu'à présent est leur oxydation, qui est un processus qui peut affecter autant la partie lipidique que la partie protéique de la LDL (Steinberg 1997). Suite à cette modification, les LDL ne sont plus reconnues par le rLDL. Les LDL oxydées sont plutôt captées par différents récepteurs *scavengers* retrouvés sur les macrophages. Ces récepteurs, n'étant pas soumis à une régulation négative de leurs expressions, peuvent prendre les LDLOx et ainsi provoquer l'accumulation d'une quantité très importante de cholestérol dans les macrophages (de Villiers *et al.* 1999). Cependant, étant donné que les LDLOx sont des particules très hétérogènes et que la quantité de ces lipoprotéines modifiées est très petite *in vivo*, il a été difficile de mettre en évidence leur présence chez l'humain. L'existence de LDL oxydées est maintenant supportée par de nombreuses études. En effet, par l'utilisation d'anticorps contre les LDLOx, il a été possible de démontrer leur présence dans les lésions athérosclérotiques (Rosenfeld *et al.* 1990 ; Yla-Herttuala *et al.* 1989) ainsi que dans la circulation (Itabe *et al.* 1994 ; Itabe *et al.* 1996). Plus récemment, il a été observé que le niveau des LDLOx en circulation augmente en fonction de la progression des lésions d'athérosclérose (Ehara *et al.* 2001 ; Nishi *et al.* 2002). Ainsi, il devient envisageable que ces lipoprotéines modifiées se trouvant en circulation puissent affecter le métabolisme osseux.

Malgré le fait que l'on retrouve des LDLOx en circulation, il est peu probable que cette oxydation des LDL se produise en circulation dans le plasma étant donné les propriétés antioxydantes de celui-ci. Ainsi, il a été proposé que cette modification

oxydative se produise dans des microdomaines de la paroi artérielle où les LDL ne pourraient bénéficier des antioxydants plasmatiques. D'ailleurs, il a été démontré que de nombreuses cellules de la paroi artérielle ont la capacité d'oxyder les LDL (Gerber *et al.* 2002 ; Heinecke *et al.* 1984 ; Lamb et Leake 1992). Bien que les mécanismes qui entraînent l'oxydation des LDL par les cellules demeurent encore assez obscurs, différentes enzymes potentielles ont été proposées. Ainsi, la myéloperoxydase qui est sécrétée par les monocytes génère différents radicaux capables d'oxyder les antioxydants, les lipides et la protéine des LDL. Cette enzyme transforme donc les LDL en une forme athérogénique qui est prise par les macrophages, ce qui mène à la formation subséquente de cellules spumeuses (Podrez *et al.* 1999). L'oxyde nitrique (NO) qui est un radical libre libéré par plusieurs cellules vasculaires pourrait également être impliqué dans l'oxydation des LDL. En effet, il a été démontré que lorsque le NO réagit avec des superoxydes, il y a génération de péroxynitrite qui est un intermédiaire oxydant très puissant (Beckman *et al.* 1990). Le péroxynitrite oxyde ensuite les lipides des LDL et convertit alors la lipoprotéine en une forme qui est reconnue par les récepteurs *scavenger* des macrophages (Graham *et al.* 1989). Cependant, il est à noter que l'implication du NO dans la génération des LDL^{ox} demeure controversée, puisqu'il a été démontré que l'oxydation des LDL par des macrophages murins est inhibée par une stimulation de la production du NO (Jessup *et al.* 1992 ; Yates *et al.* 1992). Toutefois, il est intéressant de noter que les cellules de l'os ont la capacité de produire du NO (Fox et Chow 1998). La 15-lipoxygénase est une autre enzyme qui est reconnue pour son pouvoir oxydant. En effet, il a été démontré que cette dernière peut convertir les acides gras en hydroperoxydes lipidiques et donc par le fait même oxyder les LDL (Yamamoto 1992). De plus, différentes études ont démontré que l'inhibition de cette lipoxygénase empêche l'oxydation des LDL (McNally *et al.* 1990 ; Parthasarathy *et al.* 1989). Les souris déficientes en 12/15-lipoxygénase et en apoE ont moins de plaques athérosclérotiques et cela malgré l'absence de modification dans le profil des lipoprotéines plasmatiques (Cyrus *et al.* 1999). Enfin, la sur-expression de cette enzyme dans l'endothélium

vasculaire accélère l'athérosclérose dans les souris déficientes en rLDL (Harats *et al.* 2000). Ainsi, l'ensemble de ces études indique que la 15-lipoxygénase aurait un rôle majeur à jouer dans le processus d'oxydation des LDL *in vivo*. Il est intéressant de noter que cette enzyme semble aussi jouer un rôle important dans le métabolisme osseux. En effet, une étude récente a démontré, par l'utilisation de souris déficientes en 12/15-lipoxygénase, que cette enzyme inhibe la formation osseuse (Klein *et al.* 2004). En somme, l'ensemble de ces études indique que plusieurs enzymes cellulaires sont impliquées dans l'oxydation des LDL et que le tissu osseux exprime ces enzymes. Il est donc possible que les LDL soient localement oxydées au niveau de l'os, ceci causant par la suite différents effets cellulaires nocifs pour le remodelage osseux.

Une fois initiée, l'oxydation des LDL est une réaction en chaîne de peroxydation lipidique qui est assurée par des radicaux libres. Cette peroxydation lipidique débute par une attaque des radicaux libres au niveau des liens doubles des acides gras poly-insaturés (PUFA). Ceci résulte dans le retrait d'un atome d'hydrogène associé à un groupe méthylène (CH_2). Par la suite, le réarrangement moléculaire du groupe carbone devenu instable entraîne la génération d'une configuration plus stable qui est appelée diène conjugué. Celui-ci réagit alors très rapidement avec l'oxygène et produit alors un radical peroxy. Ensuite, le radical peroxy prend un atome d'hydrogène à un PUFA adjacent pour former un hydroxypéroxyde qui est un autre type de radicaux lipidiques. Ainsi, cette réaction résulte en une propagation en chaîne qui finit par s'attaquer aux différents constituants lipidiques de la LDL et éventuellement à l'apoB-100 de la particule lipoprotéique. L'altération de cette apolipoprotéine de la LDL l'empêche d'être reconnue par le rLDL. La LDL ainsi oxydée devient alors plutôt un ligand pour les différents récepteurs *scavengers* présents à la surface des cellules (Young et McEneny 2001).

6.1.Impact cellulaire des LDLOx :

Il existe une documentation très vaste à propos des effets que les LDLOx peuvent avoir sur les différentes fonctions cellulaires. Malgré le fait que ces études aient en prédominance été réalisées au niveau endothéliale, il y a tout de même certaines informations concernant l'impact des LDLOx sur les fonctions cellulaires ostéoblastiques. Ainsi, selon ces études, il apparaît que ces composés oxydés aient un impact autant sur la survie (prolifération-apoptose) que sur la différenciation ostéoblastique.

6.1.1.Impact des LDLOx sur la différenciation ostéoblastique :

La fonction cellulaire la plus étudiée au niveau des ostéoblastes en lien avec les lipides oxydés est la différenciation ostéoblastique. Ainsi, il a été démontré que des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle médiale pouvant se minéraliser, se différencient en ostéoblastes lorsqu'elles sont exposées à des LDLOx (Parhami *et al.* 1997). Ce dernier résultat suggère donc que les LDLOx pourraient avoir un potentiel ostéogénique. Cependant, il s'avère que tel n'est pas le cas, puisqu'il a été démontré que les LDLOx inhibent la différenciation des MC3T3-E1 (cellules pré-ostéoblastiques). En effet, le groupe de Demer a montré que les LDLOx causent une inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline et aussi de la minéralisation (Parhami *et al.* 1997), qui sont des marqueurs de la différenciation ostéoblastique. De plus, le même groupe a également démontré que les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse réagissent de manière similaire aux MC3T3-E1 lorsqu'elles sont mises en présence de LDLOx (Parhami *et al.* 1999). Effectivement, il a été constaté que l'incubation des cellules M2-10B4 (lignées de cellules mésenchymateuses) en présence de LDLOx entraînait une inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline et de la minéralisation. Cette inhibition de la différenciation se ferait en partie par l'intermédiaire de la kinase régulée par des signaux extra-cellulaires (ERK), puisque l'utilisation d'un bloqueur de cette protéine de signalisation empêche l'effet

inhibiteur des LDLOx (Parhami *et al.* 1999). De plus, l'induction d'un stress oxydatif est aussi impliquée dans cette inhibition de la différenciation ostéoblastique induite par les LDLOx, car l'utilisation de différents antioxydants inhibe l'action anti-ostéogénique des LDLOx en empêchant l'accumulation de produits réactifs oxygénés (ROS) (Mody *et al.* 2001). Il a également été démontré que cette inhibition de l'activité ostéogénique des cellules mésenchymateuses se faisait au profit d'une différenciation adipogénique (Parhami *et al.* 1999), ce qui est en accord avec la présence plus importante de tissus adipeux au niveau des os ostéoporotiques humains (Meunier *et al.* 1971). Ces données obtenues *in vitro* sont aussi appuyées par des études *in vivo*. En effet, il a été démontré que les souris mises sous diète athérogénique ont une densité minérale osseuse réduite comparativement aux souris ayant reçu une diète normale (Parhami *et al.* 2001). Par contre, cette diète a des effets moins marqués sur la masse osseuse lorsqu'administrée à des souris C3H/HeJ. Étant donné que ces souris sont reconnues pour être protégées contre le développement de l'athérosclérose, il a été suggéré que des mécanismes similaires permettent de protéger les artères et les os. De plus, il a été démontré que les cellules mésenchymateuses obtenues à partir de souris mises sous une diète athérogénique ont un potentiel ostéogénique réduit étant donné leur habilité réduite à se différencier en ostéoblastes comparativement aux cellules provenant des souris contrôles (Parhami *et al.* 1999). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indiquent que les LDLOx pourraient causer l'ostéoporose chez les patients ayant des niveaux élevés de cholestérol plasmatique.

6.1.2.Impact des LDLOx sur la survie cellulaire :

Il est reconnu et accepté que les LDLOx ont un impact très important sur la survie cellulaire, particulièrement au niveau des cellules des parois vasculaires. En effet, de nombreuses études ont démontré que les LDLOx ont un effet prolifératif sur les différents types cellulaires que l'on retrouve au niveau de la paroi vasculaire, tels que

les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (SMC) (Apostolov *et al.* 2006 ; Lin *et al.* 2007 ; Martens *et al.* 1998). Cette action proliférative des LDLOx a été d'une part attribuée à l'habilité de ces lipoprotéines modifiées à induire différentes voies de signalisation impliquées dans la survie ou bien la prolifération cellulaire. À titre d'exemple, il a notamment été démontré que la prolifération induite par les LDLOx est causée par l'activation de la voie des ERK, puisqu'un inhibiteur de cette voie empêche la stimulation de la synthèse d'ADN, mesurée par l'incorporation de thymidine, causée par les LDLOx au niveau des SMC (Lin *et al.* 2007). L'implication de cette voie dans la prolifération induite par les LDLOx a aussi été montrée au niveau des cellules endothéliales (Apostolov *et al.* 2006). Une autre voie qui a été rapportée comme étant impliquée dans la prolifération des cellules exposées aux LDLOx est la voie de la protéine kinase B qui est aussi nommée AKT. En effet, il a été démontré que les LDLOx induisaient la prolifération des macrophages et des SMC par l'activation de cette voie (Auge *et al.* 2002 ; Martens *et al.* 1998). En plus de ce rôle dans la prolifération cellulaire, l'induction d'AKT par les LDLOx a également été associée à un mécanisme de survie cellulaire. En effet, il a été démontré que l'activation de cette voie par les LDLOx cause la survie des macrophages via l'activation de voies anti-apoptotiques (Hundal *et al.* 2001). Ainsi, l'ensemble de ces données indiquent que les LDLOx ont la capacité d'induire la prolifération en activant directement les différentes voies de survie ou bien de prolifération cellulaire. Cependant, cette activité mitogénique des lipoprotéines modifiées a également été attribuée à l'induction de la libération de différents facteurs de croissance. En effet, il a été démontré que les LDLOx causent une sécrétion rapide et importante du facteur stimulant les colonies monocytaires et granulocytaires (GM-CSF). Cette sécrétion étant impliquée dans la prolifération des macrophages induite par les LDLOx, puisque la présence d'un anticorps anti-GM-CSF inhibe l'incorporation de thymidine induite par les LDLOx (Biwa *et al.* 1998). De plus, un mécanisme similaire a aussi été mis en évidence au niveau des SMC,

mais cette fois par l'intermédiaire de la sécrétion du facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Chai *et al.* 1990).

Malgré le fait que l'action mitogénique des LDLOx a été jusqu'à présent très peu étudiée au niveau des cellules ostéoblastiques, il a tout de même été démontré que les LDLOx induisent la prolifération des MC3T3-E1, puisqu'il y a une hausse de synthèse d'ADN lorsque ces cellules sont exposées à des LDLOx (Parhami *et al.* 1997). Cependant, les voies de signalisation menant à cette prolifération demeurent encore inconnues. À première vue, cette induction de la prolifération des ostéoblastes par les LDLOx pourrait suggérer que ces dernières ont une action ostéogénique *in vivo*. En effet, une hausse de prolifération pourrait entraîner une augmentation du nombre d'ostéoblastes et ainsi une plus grande capacité de formation osseuse. Cependant, il est connu que l'induction des gènes associés à la formation de la matrice osseuse et aussi à la minéralisation nécessite une réduction de la prolifération des ostéoblastes (Owen *et al.* 1990 ; Stein *et al.* 1990). Ainsi, il est probable qu'en stimulant la prolifération, les LDLOx réduisent la formation osseuse et mènent alors au développement de l'ostéoporose.

6.1.3.Impact des LDLOX sur la mort cellulaire :

En plus de leurs aptitudes à induire la prolifération, les LDLOx ont également la capacité d'induire la mort cellulaire. En effet, de nombreuses études menées au niveau cardio-vasculaire ont indiqué qu'à des concentrations élevées, ces lipoprotéines vont causer la mort cellulaire en induisant un processus d'apoptose. Ce phénomène est retrouvé dans plusieurs types cellulaires, tels que les cellules endothéliales coronaires humaines (Li et Mehta 2000), les SMC (Kataoka *et al.* 2001) et les macrophages (Hardwick *et al.* 1996). De plus, il a récemment été démontré que les LDLOx induisent également la mort cellulaire par apoptose des cellules ostéoblastiques. En effet, Klein *et al.* (2003) ont montré qu'il y a une baisse du nombre de cellules lorsque la lignée ostéoblastique humaine SaOS est exposée à des

LDLOx. Cependant, cette même étude montre que les LDL natives induisent des effets similaires aux LDLOx. Les auteurs expliquent ce résultat surprenant par la possibilité que leurs LDL aient été oxydées durant les étapes de l'isolement des lipoprotéines. De plus, ce même groupe a montré que les LDL induisent l'apoptose des cellules SaOS en inhibant d'une part la voie de survie cellulaire AKT et également en activant la voie d'apoptose mitochondriale (Klein *et al.* 2006). Par contre, le protocole utilisé dans cette étude ne permet pas d'évaluer la masse de LDL qui a été mise en contact avec les cellules. Cet aspect est d'autant plus important, puisque le niveau d'oxydation des LDL n'a également pas été caractérisé. Ainsi, selon le résultat obtenu, il est possible qu'une masse importante ait été utilisée, ce qui pourrait cette fois-ci expliquer l'effet apoptotique des LDL natives qui ne sont pas reconnues pour induire un tel effet. En effet, même en considérant que les LDL utilisées ne soient que très peu oxydées, la présence d'une masse importante augmente les risques de transfert de lipides oxydés aux cellules et ainsi les effets néfastes pouvant en résulter. Récemment, une étude a montré qu'il y a une augmentation du nombre d'ostéoblastes en apoptose retrouvés au niveau de l'os de souris normales mises sous diète athérogénique ; cet effet causé par la diète étant encore plus marqué pour les souris déficientes en apoE. Ce résultat suggère donc que des conditions athérogéniques (niveaux de LDL élevés) entraînent la mort des ostéoblastes. Cette hypothèse est supportée par la démonstration que les ostéoblastes provenant de cultures primaires d'os de souris déficientes en apoE montrent des signes d'apoptose accentués comparativement aux cellules contrôles exposées aux LDLOx (Hirasawa *et al.* 2007). Cette augmentation de mort cellulaire est corrélée avec une hausse d'expression protéique de la protéine p53. Ainsi, l'induction de p53 serait responsable de l'apoptose induite par les LDLOx au niveau des ostéoblastes de souris ApoE^{-/-}. Il est cependant important de mentionner qu'il y a de nombreuses voies de signalisation apoptotique induites par les LDLOx qui ont été identifiées dans différents types cellulaires. Ainsi, il reste encore beaucoup à faire afin de caractériser

les différents mécanismes menant à la mort des ostéoblastes induite par les LDLOx. Ceci constitue donc un aspect qui sera exploré dans le présent projet de doctorat.

Malgré le fait que les LDLOx puissent être modifiées autant au niveau de leur partie protéique que lipidique, leur toxicité est généralement associée à la fraction lipidique ayant été oxydée (Negre-Salvayre *et al.* 1990). En effet, les LDLOx contiennent une très grande variété de composés lipidiques qui sont nocifs pour la cellule. Cette grande variété de lipides oxydés rend difficile la détermination de la contribution relative de chacun dans l'effet apoptotique des LDLOx. Lorsque les LDLOx se lient à leurs nombreux récepteurs présents à la surface cellulaire, les lipides oxydés contenus dans les LDLOx pourraient probablement être transférés à la membrane plasmique et entraîner la mort en interagissant avec les composés de la membrane (Kaplan et Aviram 2000). Cependant, il a été démontré que l'internalisation des LDLOx par les cellules est requise pour que ces dernières aient un effet cytotoxique (Negre-Salvayre *et al.* 1990). Ainsi, il est plus probable que les effets toxiques proviennent davantage d'une accumulation cellulaire de composés nocifs suivant la prise des LDLOx par l'intermédiaire de leurs récepteurs cellulaires. D'ailleurs, plusieurs études ont montré que les LDLOx prises par les cellules sont dirigées vers les compartiments lysosomaux où elles s'accumulent. En effet, il a été montré qu'il y a une accumulation de cholestérol libre dans les lysosomes de macrophages exposés aux LDLOx (Maor *et al.* 1995 ; Podrez et Aviram 1994). Cette accumulation est causée par l'incapacité des enzymes lysosomales à hydrolyser le cholestérol estérifié des LDLOx, puisque ces lipoprotéines inactivent les enzymes présentes à l'intérieure des lysosomes (Lougheed *et al.* 1991 ; Hoppe *et al.* 1994). Un autre processus expliquant cette accumulation réside dans le fait que le cholestérol des LDLOx est résistant un processus d'efflux de cholestérol (Yancey et Jerome 2001). De plus, il a été rapporté que la partie protéique des LDLOx est dégradée de manière moins efficace que celle des LDL acétylées et qu'ainsi il y a accumulation d'apolipoprotéine B dans les compartiments lysosomaux (Jessup *et al.* 1992). Cette dégradation moins

efficace a également été observée par le groupe de madame Brissette qui a démontré que la dégradation des LDLOx est moins accentuée comparativement à celle des LDL natives au niveau des cellules HepG2 (Rhainds *et al.* 1999). Ainsi, cette accumulation lysosomale a pour effet d'entraîner une perte de l'intégrité membranaire des lysosomes. En effet, il a été démontré que les lysosomes des macrophages sont endommagés lorsque ces cellules sont exposées à des LDLOx (Yuan *et al.* 1997). Cette perte d'intégrité des parois lysosomales pourrait ainsi être impliquée dans les effets apoptotiques, puisque la rupture des membranes des lysosomes en présence des LDLOx mène à la libération dans le cytosol et le noyau des différentes enzymes lysosomales, telles que les cathepsines B, D et L (Li et Yuan 2004). De plus, il a été démontré que la perméabilisation lysosomale et donc la libération des enzymes mènent à l'apoptose par l'intermédiaire d'une voie dépendante des mitochondries (Boya *et al.* 2003). Il a aussi été rapporté que l'inhibition de l'expression de la cathepsine D empêche la mort des neuroblastomes causée par le peroxyde d'hydrogène qui induit une perte d'intégrité lysosomale (Castino *et al.* 2007). Cependant, l'implication des enzymes lysosomales dans l'apoptose induite par les LDLOx n'a pas encore été démontrée directement.

6.1.3.1.Effets protecteurs des HDL :

Il est bien connu que les HDL sont associées à des effets cardio-protecteurs. En effet, il existe une corrélation inverse entre les niveaux de HDL plasmatiques et le développement des maladies cardio-vasculaires (Gordon *et al.* 1998). Cependant, il s'avère que la situation n'est pas aussi claire en ce qui concerne l'impact des HDL sur le tissu osseux. En effet, contrairement à l'effet bénéfique des HDL au niveau cardiaque, certaines études ont rapporté une corrélation inverse entre les niveaux de HDL plasmatiques et la densité minérale osseuse (Majima *et al.* 2008 ; Martínez-Ramírez *et al.* 2007). Toutefois, en opposition, d'autres études proposent plutôt une corrélation positive (Dennison *et al.* 2007 ; Solomon *et al.* 2005 ; Yamaguchi *et al.* 2002) et ainsi un effet bénéfique potentiel des HDL sur l'intégrité du tissu osseux.

De plus, en accord avec une action positive des HDL sur la masse osseuse, il a été rapporté que ces lipoprotéines induisent la mort des ostéoclastes et pourraient ainsi prévenir la résorption de la matrice osseuse (Luegmayr *et al.* 2004). Au niveau vasculaire, l'effet protecteur des HDL a initialement été associé à la capacité de ces lipoprotéines d'assurer le transport inverse du cholestérol (Kwiterovich 1998). Ce processus implique, dans un premier temps, un efflux de cholestérol en surplus à partir des différentes cellules périphériques vers les HDL. Par la suite, les HDL permettent l'élimination de ce cholestérol de l'organisme en l'acheminant au foie. Par contre, les HDL ont de nombreuses autres propriétés anti-athérogéniques. L'une d'entre elles est leur capacité d'empêcher l'oxydation des LDL. En effet, les HDL transportent de nombreuses enzymes qui empêchent la formation des produits d'oxydation bioactifs au niveau des LDL. De plus, les différents antioxydants transportés par les HDL peuvent interrompre la cascade d'événements menant à l'oxydation des LDL (Navab *et al.* 2004). Les HDL ont également une action bénéfique au niveau de l'endothélium par leur habilité à induire la formation de NO qui est reconnu pour induire la vasodilatation des artères (Rämet *et al.* 2003)

Une autre propriété importante des HDL est leur habilité à inhiber la mort cellulaire induite par les LDLOx. À cet effet, les HDL semblent pouvoir inhiber la mort induite par les LDLOx par différents mécanismes. Notamment, il a été rapporté que les HDL inhibent l'apoptose des cellules monocytaires RAW264.7 en induisant l'efflux de cholestérol et ainsi en empêchant l'accumulation de cholestérol causée par la présence des LDLOx (Jiang *et al.* 2006). Il a également été démontré que les HDL préviennent l'entrée de calcium impliquée dans l'apoptose induite par les LDLOx au niveau des cellules endothéliales (Suc *et al.* 1997). L'inhibition de la mort cellulaire induite par les LDLOx pourrait également être due à la capacité des HDL à induire des voies de signalisation favorisant la survie cellulaire. L'une de ces voies implique l'activation de la protéine kinase phosphoinositol-3 (PI3-K) qui va ensuite entraîner la phosphorylation d'AKT qui est reconnue pour favoriser la survie cellulaire (Nofer *et*

al. 2001). Cette action protectrice provient en fait des lysosphingolipides transportés par les HDL. Ainsi, suite à la liaison des HDL à la membrane cellulaire, ces lipides vont lier leurs récepteurs respectifs et ainsi activer la voie de signalisation AKT (Kimura *et al.* 2003). L'activation d'AKT mène également à la stimulation de la formation de NO qui pourrait inhiber l'apoptose en empêchant l'activation des caspases (Dimmeler *et al.* 1999). Il a également été démontré que les HDL préviennent la génération de ROS induite par les LDLOx (Lee *et al.* 2005 ; Robbesyn *et al.* 2003). Ainsi, puisque cette production de ROS a été impliquée dans les effets apoptotiques des LDLOx (Chen *et al.* 2007), il est possible que ceci constitue un autre mécanisme par lequel les HDL assurent la survie cellulaire. Les antioxydants transportés par les HDL pourraient également être impliqués dans cette protection de la mort cellulaire. En effet, il a été démontré que la vitamine E inhibe l'apoptose induite par les LDLOx au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (de Nigris *et al.* 2000 ; Vieira *et al.* 1998). Ainsi, les HDL étant reconnues pour transporter la vitamine E pourraient inhiber la mort cellulaire causée par les LDLOx en transférant aux cellules des antioxydants. D'ailleurs, le groupe de Sattler a montré que les HDL peuvent transférer par captation sélective la vitamine E aux cellules endothéliales (Balazs *et al.* 2004). Bref, malgré l'ensemble de ces actions produites par les HDL, il y a encore bien peu d'information quant aux mécanismes permettant l'inhibition de la mort cellulaire induite par les LDLOx.

6.2. Récepteurs des LDL oxydées :

Il existe différents récepteurs *scavengers* capables de lier et d'effectuer le métabolisme des LDLOx. Il y a notamment le récepteur *scavenger* de classe A qui fut le premier à être isolé et cloné (Ling *et al.* 1997). Par la suite, de nombreux autres récepteurs des LDLOx ont été découverts. En effet, jusqu'à présent plus de 10 récepteurs *scavengers* ont été décrits (Mertens et Holvoet 2001). Un tableau décrivant les ligands et lieu d'expression de ces récepteurs est présenté à la table 1.1. Puisque les résultats présentés dans cette thèse pointent en direction d'un récepteur pouvant

interagir à la fois avec les lipoprotéines natives et oxydées, dans le cadre de cette section de l'état des connaissances, nous porterons notre attention sur les récepteurs

Table 1.1 : Table récapitulative des différents récepteurs *scavengers* répertoriés.

Classe	Nom	Ligands	Distribution Cellulaire
A	SR-A	LDLOx, LDLAc	Macrophages
B	SR-BI	LDLOx, LDLAc HDL, LDL	Cellules stéroïdogénique Foie Macrophages
	SR-BII		
	CD36	LDLOx, LDLAc HDL, LDL Acides gras Cellules apoptotiques	Macrophages Plaquettes Cœur Foie
C	SR-C (Drosophile)	-	-
D	Macrosialine	LDLOx	Macrophages
	CD68	LDLOx	Macrophages
E	LOX-1	LDLOx	Cellules endothéliales Cellules musculaires Macrophages
F	SREC	LDLAc	Cellules endothéliales
Autres	CL-P1	LDLOx	Cellules endothéliales
	SROX-PS	LDLOx	Macrophages

Abbréviation : SR-A ; Récepteur *scavenger* de classe A, SR-C ; Récepteur *scavenger* de classe C, CD68 ; Récepteur *scavenger* de classe D, type 68, LOX-1 ; Récepteur lectine-1 des LDLOx, SREC ; Récepteur *scavenger* exprimé par les cellules endothéliales, CL-P1, Récepteur collectine du placenta, SROX-PS ; Récepteur *scavenger* des LDLOx et de la phosphatidylsérine. (Modifiée de Itabe, 2003)

scavengers de classe B envers les LDLOx, puisque les travaux retrouvés dans cette thèse concernent l'activité de ces derniers.

6.2.1. Le « cluster of differentiation 36 » (CD36) :

Jusqu'à ce jour, le rôle physiologique du CD36 en relation avec les lipoprotéines a été essentiellement associé à la captation des LDLOx (Endemann *et al.* 1993). En effet, il a été montré que le CD36 permet la prise et la dégradation des LDLOx dans les plaquettes et les macrophages (Oquendo *et al.* 1989 ; Pearce *et al.* 1998). Le CD36 permet ainsi la dégradation de ces lipoprotéines modifiées par une voie passant par les lysosomes, puisque cette dégradation est inhibée par l'utilisation de chloroquine (Pearce *et al.* 1998). Par l'utilisation de macrophages provenant de souris déficientes en CD36, le groupe de Febbraio a montré une baisse significative de la liaison et de la prise des LDLOx comparativement aux macrophages de souris contrôles (Febbraio *et al.* 1999). Similairement, des macrophages provenant de patients n'exprimant pas le CD36 lient 40% moins les LDLOx et accumulent aussi 40% moins d'EC que les macrophages de sujets normaux (Nozaki *et al.* 1995). De plus, par l'utilisation d'un anticorps anti-CD36 bloquant, il a été démontré que le CD36 est partiellement responsable de l'association et de la dégradation des LDLOx au niveau de cellules HepG2 (Rhainds *et al.* 2003) et de plus de 50% de la liaison des LDLOx à des macrophages dérivant de monocytes humains (Nicholson *et al.* 1995). Une autre étude a également démontré que la liaison des LDLOx est inhibée par la présence de vésicules contenant des phospholipides anioniques (Rigotti *et al.* 1995). Enfin, dans une étude à laquelle j'ai contribué, le groupe de madame Brissette a rapporté par l'utilisation de souris déficientes en CD36, que ce dernier est impliqué dans la clairance plasmatique des LDLOx (Luangrath *et al.* 2008). Ainsi, l'ensemble de ces études indique clairement que le CD36 est un récepteur qui peut lier et internaliser les LDL ayant subies une oxydation. Cependant, malgré le fait que l'expression du CD36 ait été rapportée aux niveaux des cellules osseuses (Carron *et al.* 2000), sa fonction dans ce tissu demeure toujours inconnue.

6.2.2. Le récepteur *scavenger* de classe B et de type I (SR-BI) :

Malgré le fait qu'il ait été démontré que le SR-BI est en mesure de lier les LDLOx (Acton *et al.* 1994), très peu d'études jusqu'à présent ont tenté de vérifier si ce récepteur avait un rôle majeur à jouer dans le métabolisme de ces LDL modifiées. Cependant, de nombreuses études suggèrent que le SR-BI pourrait jouer un rôle majeur envers les LDLOx, puisque ce récepteur est retrouvé au niveau des macrophages des lésions athéromateuses de souris (Chinetti *et al.* 2000). De plus, il a été rapporté que les LDLOx peuvent se lier avec une affinité modérée à des cellules qui expriment un haut niveau de SR-BI, comme les cellules hépatiques (Rhainds *et al.* 1999). Ainsi, des hépatocytes humains en culture primaire sont capables de prendre et de dégrader les LDLOx par une voie lysosomale (Edge *et al.* 1986). Le groupe de madame Brissette a également rapporté que les LDLOx peuvent se lier aux cellules HepG2, et que cette liaison est inhibée par d'autres ligands du SR-BI. Dans cette étude, il a également été rapporté que les LDLOx sont efficacement dégradées (Rhainds *et al.* 1999). Récemment, une étude menée avec des cellules CHO sur-exprimant le SR-BI a clairement démontré que ce dernier est en mesure de lier avec une haute affinité les LDLOx et que suite à cette liaison les LDLOx étaient internalisées et dégradées par une voie de captation globale (Gillotte-Taylor *et al.* 2001). Cependant, il est étonnant de constater l'absence de captation sélective des EC présents dans les LDLOx, puisque le SR-BI est connu comme étant un récepteur faisant de la captation sélective. Ce dernier résultat contredit aussi les études faites par le groupe de Van Berkel qui a démontré *in vitro* et *in vivo* que les EC de HDL soumises à l'oxydation pouvaient être pris sélectivement par l'intermédiaire du SR-BI (Fluiter *et al.* 1996). De plus, le groupe de madame Brissette a aussi rapporté que les EC des LDLOx peuvent être captés sélectivement par les cellules HepG2. Puisque cette captation sélective des EC est réduite lorsque les LDL modifiées marquées sont co-incubées avec des HDL, LDL, BSA maléylée, il a été suggéré que les SR-BI et/ou le CD36 est/sont impliqué(s) dans la captation sélective des EC provenant des

LDLOx (Rhainds *et al.* 1999). Toutefois, les expériences de clairance plasmatique effectuées chez des souris déficientes en SR-BI indiquent que ce récepteur n'est pas impliqué *in vivo* dans la captation sélective faite à partir des LDLOx (Luangrath *et al.* 2008). Enfin, dans une étude à laquelle j'ai contribué durant ce doctorat, le groupe de madame Brissette a montré par l'utilisation de souris déficientes en SR-BI, que ce récepteur est impliqué dans la captation sélective des EC des LDL fortement oxydées au niveau des cellules hépatiques non parenchymateuses (Bourret, Brodeur *et al.* 2006).

7. Buts et objectifs généraux :

L'objectif de ce projet de doctorat était dans un premier temps de déterminer si les cellules ostéoblastiques sont en mesure d'effectuer le métabolisme des lipoprotéines, soit des LDL et HDL, et également de démontrer l'expression et l'implication des récepteurs *scavengers* de classe B (SR-B) dans ce métabolisme probable. L'importance d'étudier cet aspect provenait d'une part du fait que des études antérieures ont démontré que les lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL) jouent un rôle important dans les différentes fonctions des ostéoblastes. Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'avait été réalisée en lien avec le métabolisme des LDL et des HDL qui sont pourtant les lipoprotéines les plus abondantes dans la circulation. De plus, tout comme les lipoprotéines riches en TG, les LDL et les HDL sont reconnues pour transporter différents composés qui sont vitaux aux fonctions des ostéoblastes, tels que l'oestrogène et également différentes vitamines lipophiles, telles que les vitamines E et K. Il s'avérait donc important d'entreprendre une telle étude et ainsi de déterminer la possibilité que ces lipoprotéines assurent l'acheminement du cholestérol et de l'oestrogène aux ostéoblastes. En parallèle, il devenait aussi important de s'intéresser à l'expression des différents récepteurs *scavengers* de classe B, puisqu'il a été démontré que ces derniers sont très impliqués dans le métabolisme des LDL et des HDL. De plus, étant donné que les fibroblastes et les adipocytes expriment ces récepteurs et que les ostéoblastes dérivent des mêmes précurseurs, il

nous apparaissait plus que probable que les cellules ostéoblastiques expriment également les SR-B. Enfin, l'importance de la démonstration de l'expression de ces récepteurs par les ostéoblastes est également mise en valeur par le fait que ces récepteurs sont reconnus pour être impliqués dans le métabolisme des LDL_{Ox} qui pourraient potentiellement être impliqués dans l'ostéoporose résultant de conditions athérogéniques. Ainsi, pour ce faire, différentes approches ont été utilisées. Tout d'abord, pour étudier le métabolisme des LDL et des HDL, ces dernières ont été marquées radioactivement afin de pouvoir déterminer le métabolisme autant de la partie protéique que de la partie lipidique. Par la suite, des essais de liaison, de captation sélective et de dégradation ont été réalisés. Ceci, en vue de déterminer la présence de sites de liaison aux lipoprotéines à la surface des ostéoblastes et aussi afin de déterminer les mécanismes (captation globale et sélective) permettant la prise du cholestérol par les cellules ostéoblastiques. Afin de s'assurer que les résultats obtenus n'étaient pas restreints à un seul type de cellules, nous avons eu recours à différents modèles ostéoblastiques humains et murins. En vue de démontrer l'expression des SR-B, des réactions polymérase en chaîne inversées (RT-PCR) et des immunobuvardages ont été réalisés à partir d'extraits cellulaires de l'ensemble des types de cellules utilisées. L'implication de ces récepteurs dans le métabolisme de ces lipoprotéines a été déterminée à l'aide d'expériences de compétition par l'utilisation des LDL_{Ox} qui sont des ligands reconnus de ces récepteurs. Enfin, il est important de mentionner que des expériences similaires ont été réalisées afin de déterminer la capacité des LDL et des HDL à transférer aux ostéoblastes l'oestrogène contenue par ces dernières. Pour ce faire, de l'estradiol marquée radioactivement a été incorporée dans ces lipoprotéines natives et des essais de captation sélective ainsi que de compétition ont été réalisés. L'ensemble des données obtenues a permis l'écriture d'un article (Chapitre II) qui fut accepté et publié dans la revue *The Journal of Bone and Mineral Research*. Cet article fut par la suite le sujet d'un commentaire positif sous forme de lettre à l'éditeur dans cette même revue (Annexe I).

Suite à la démonstration de l'expression de récepteurs aux LDLOx à la surface des ostéoblastes (Chapitre II), notre intérêt s'est porté vers le métabolisme des LDLOx par les cellules ostéoblastiques, et par le fait même sur l'impact de ce métabolisme sur la survie de ces cellules. Malgré le fait que quelques études aient rapporté que les LDLOx puissent induire la prolifération et également la mort cellulaire, la caractérisation de ces effets demeure passablement sommaire. De plus, étant donné que la prise cellulaire de ces lipoprotéines est reconnue pour être un mécanisme important dans l'induction des effets toxiques, il nous apparaissait donc primordial d'une part de caractériser le métabolisme des LDLOx par les ostéoblastes afin de déterminer la capacité de ces cellules à internaliser ces lipoprotéines modifiées. Pour ce faire, les LDLOx ont été marquées radioactivement au niveau de leur partie protéique et lipidique et des essais de dégradation, d'association protéique et lipidique ont été réalisés afin de déterminer les mécanismes qui pourraient permettre la prise des LDLOx. En parallèle, nous avons utilisé différentes approches expérimentales en vue de déterminer les effets des LDLOx sur la survie des ostéoblastes. Ainsi, des essais de transformation mitochondriale du jaune de tétrazolum (MTT), des expériences d'incorporation de thymidine, d'externalisation de la phosphatidylsérine, de fragmentation d'ADN et des marquages à l'acridine orange ont été réalisés afin de déterminer l'impact des LDLOx sur la survie, la prolifération et la mort des ostéoblastes. De plus, pour établir un lien entre le métabolisme des LDLOx et les effets sur la viabilité cellulaire, nous avons eu recours à la chloroquine qui est un agent permettant d'inhiber l'activité de dégradation lysosomale des lipoprotéines ; l'inhibition d'une partie de ce métabolisme permettant ainsi de voir une augmentation ou une diminution des effets des LDLOx. Enfin, étant donné que dans la circulation les niveaux des LDLOx sont relativement bas, il nous apparaissait peu probable que des quantités appréciables de ces particules puissent entrer en contact avec les cellules ostéoblastiques. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la présence des LDLOx au niveau du tissu osseux soit causée par une oxydation des LDL par les ostéoblastes. Nous avons donc étudié la capacité de ces cellules à induire l'oxydation

des LDL. Pour ce faire, les LDL incubées en présence d'ostéoblastes ont été caractérisées par l'utilisation de gels agarose-barbital et les niveaux des produits d'oxydation ont également été évalués. L'ensemble des données obtenues a permis l'écriture d'un article (Chapitre III) qui fut accepté et publié dans la revue *Free Radical Biology and Medicine*. Cet article fut également le sujet d'un commentaire positif dans cette même revue (Annexe II).

Étant donné la démonstration des effets toxiques des LDLOx sur les ostéoblastes (Chapitre III), nous avons ensuite évalué la possibilité d'inhiber ces effets nocifs. Ainsi, puisque les HDL sont reconnues pour avoir des actions cardio-protectrices, nous avons émis l'hypothèse qu'elles pourraient jouer un rôle similaire au niveau de l'os. Ceci est appuyé par la démonstration que les HDL ont la capacité d'inhiber la calcification vasculaire et qu'une corrélation positive a été établie entre les niveaux de HDL plasmatiques et la densité minérale osseuse. De plus, quelques études au niveau des cellules vasculaires ont montré que les HDL inhibent les effets cytotoxiques des LDLOx. Donc, nous avons entrepris de déterminer si les HDL peuvent inhiber l'apoptose induite par les LDLOx au niveau des cellules ostéoblastiques. Pour ce faire, nous avons déterminé l'impact de la présence de HDL sur les effets toxiques des LDLOx par l'utilisation d'essais MTT et d'expériences d'externalisation de la phosphatidylsérine. De plus, étant donné la démonstration que le métabolisme des LDLOx joue un rôle important sur la viabilité ostéoblastique (Chapitre III), nous avons porté notre attention sur l'impact des HDL sur ce métabolisme. Ainsi, des essais de compétition ont été réalisés. Nous avons également évalué l'impact des HDL sur le métabolisme des LDLOx en pré-incubant les ostéoblastes avec des HDL et en observant ensuite le métabolisme des LDLOx par des essais d'association protéique et lipidique. Pour compléter l'analyse de ce métabolisme pouvant possiblement être modifié par les HDL, les niveaux d'expression des récepteurs des LDLOx ont été évalués, ainsi que l'intégrité

lysosomale. Les données obtenues ont permis l'écriture d'un article qui a été soumis à la revue *Journal of Cellular Biochemistry*.

CHAPITRE II

Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL₃.

Mathieu R. Brodeur¹, Louise Brissette², Louise Falstrault², Vilayphone Luangrath², and Robert Moreau¹

¹Laboratoire du métabolisme osseux, ²Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines,

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique, qui fut accepté pour publication dans la revue *The Journal of Bone and Mineral Research*, est le résultat d'un travail d'équipe. Ainsi, les cultures cellulaires (lignées et primaires), les immunobuvardages, les RT-PCR, les marquages à l'estradiol des lipoprotéines et la réalisation des essais d'association protéique et lipidique, de dégradation et de compétition furent réalisés par l'auteur de cette thèse (M. Brodeur). Les résultats concernant la localisation cellulaire des SR-B (figure 2.4) sont le résultat du travail de Vilayphone Luangrath. Le marquage des lipoprotéines, autre qu'estradiol, a été effectué par Louise Falstrault qui a également contribué en assurant le maintien des colonies de souris. J'ai écrit le manuscrit et réalisé les figures et fait les corrections en fonction des commentaires judicieux de Louise Brissette et Robert Moreau. Ces deux derniers ont également contribué en assurant les supports financier et intellectuel essentiels à la réalisation d'un tel travail.

ABSTRACT

Lipoproteins transport many vitamins and hormones which have been shown to be necessary for bone formation. However, the metabolism of low and high density lipoproteins (LDL and HDL₃) by bone-forming osteoblastic cells remains unknown. Here we report that osteoblastic cells express scavenger receptors of class B which are implicated in the uptake of cholesterol and estradiol from LDL and HDL₃.

Introduction: The bone tissue is continuously remodeled and its integrity requires a balance between osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation. Recent studies have reported the importance of triglyceride-rich lipoproteins for the delivery of lipophilic vitamins necessary for normal bone metabolism. However, the ability of osteoblastic cells to process LDL and HDL₃ and the receptors involved remain unknown.

Methods: Binding, competition, degradation and selective uptake assays with LDL and HDL₃ radiolabelled in their protein and lipid moieties or with ³H-estradiol were conducted on human osteoblasts (MG-63 cell line and primary cultures of human osteoblasts (hOB cells)) and on mouse osteoblasts (MC3T3-E1 cell line and primary cultures of murine osteoblasts (mOB cells)). The expression of scavenger receptors by osteoblastic cells was determined by RT-PCR and Western immunoblotting, and cellular localization was assessed by sucrose gradient fractionation.

Results: Osteoblastic cells were able to bind, internalize and degrade HDL₃ and LDL, and are capable of selectively taking up cholesteryl esters (CE) from these lipoproteins. Also, we provide evidence that osteoblastic cells express SR-BI, SR-BII and CD36 (SR-Bs receptors) and that these receptors are localized in membrane lipid rafts or caveolin-rich membranes. The selective uptake of CE from LDL and HDL₃ by osteoblastic cells was strongly competed by the known SR-B ligand oxidized LDL indicating that SR-B receptors are responsible for the selective uptake. Finally, estradiol carried by LDL and HDL₃ was selectively transferred to the osteoblastic cells also via SR-B receptors.

Conclusion: Overall, our results suggest a novel mechanism for the routing of

cholesterol and estradiol to osteoblasts involving the metabolism of LDL and HDL₃ by SR-B receptors.

2.1. INTRODUCTION

Osteoporosis is regarded as the loss of equilibrium between osteoblastic and osteoclastic functions characterized by increased osteoclast-mediated bone resorption over bone formation by osteoblasts leading to reduced bone mass, lower mineral density, and thereby higher bone fragility and susceptibility to fractures. Although the exact etiology of osteoporosis remains to be clarified in numerous cases, some risk factors have been identified such as the loss of gonadal hormonal function (Jerome 2004), hyperparathyroidism (Chapuy *et al.* 1996), the alterations of intestinal and renal functions (Frankenfeld *et al.* 2006 ; Sprague *et al.* 2007), and medical treatments (the long-term use of glucocorticoids) (De Vries *et al.* 2007). Recently, epidemiologic studies have also revealed a correlation between atherosclerosis and the development of osteoporosis (Barengolts *et al.* 1998 ; Shiraki *et al.* 1997 ; Uyama *et al.* 1997). Indeed, it is well established that cardiovascular diseases are directly related to plasma concentrations of LDL cholesterol (Castelli *et al.* 1977), and a number of studies have recently demonstrated that bone metabolism is also affected by blood cholesterol levels. More specifically, it was shown that patients with lower bone density and osteoporosis present higher lipid levels (Barengolts *et al.* 1997 ; Laroche *et al.* 1994 ; Uyama *et al.* 1997), that an atherogenic high-fat diet reduces bone formation in atherosclerosis-susceptible C57BL/6 mice (Parhami *et al.* 2001), and that cholesterol lowering drug statins promote bone formation and are associated with a marked reduction of bone fractures (Edwards *et al.* 2000 ; Meier *et al.* 2000 ; Schoofs *et al.* 2000). However, both observations and clinical studies on this last topic generated conflicting results and the beneficial effect of statins on bone metabolism remains therefore under debate (Rizzo *et al.* 2004). Relationships between lipoprotein metabolism and normal bone remodelling have also been

reported. Indeed, human osteoblasts have been found to express receptors of the LDL-receptor (LDLr) family which have the ability to take up triglyceride-rich lipoproteins (TRL) through an endocytotic pathway (Niemeier *et al.* 2004). The uptake of these lipoproteins is believed to allow the delivery of dietary vitamin K to the bone given that it was shown that lipoprotein-associated vitamin K is internalized by the osteoblasts (Newman *et al.* 2002). This uptake is thought to be apoE-dependent since osteoblasts from apoE-deficient mice show less uptake of vitamin K-containing TRL which results in osteocalcin functional defect due to the impairment of vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin (Schilling *et al.* 2005). Although the experimental findings described above demonstrate that lipoproteins are important to normal bone metabolism, little is known about how bone cells metabolize lipoproteins.

LDL and HDL are the most abundant lipoprotein classes of the plasma and may therefore be important in the routing of cholesterol to the osteoblastic cells. In addition to their role in cholesterol transport, LDL and HDL are also carriers of lipophilic vitamins such as vitamins E and K. The former vitamin is an antioxidant with various beneficial effects on bone metabolism (Maggio *et al.* 2003 ; Turk *et al.* 2004 ; Zhang *et al.* 2006), while the later is required for osteocalcin carboxylation (Pan *et al.* 1985). It has been shown that estrogens can become associated with LDL after esterification (Leszczynski *et al.* 1990 ; Tang *et al.* 1997) and that this association increases the LDL particle resistance to oxidation (Shwaery *et al.* 1997 ; Shwaery *et al.* 1998). Moreover, recently, Smart's group demonstrated that HDL deliver estradiol to human endothelial cells (Gong *et al.* 2003). This capacity of lipoproteins to transport estrogens in the blood circulation is an important research field given the well known importance of estrogens on bone metabolism. Plasma levels of LDL cholesterol are in large part regulated via the LDLr, which mediates the uptake of LDL through a well-defined process involving endocytosis and degradation of the entire LDL particle (Brown *et al.* 1986 ; Goldstein *et al.* 1974). In

contrast, uptake of HDL cholesterol seems to be accomplished by another pathway designated as selective uptake, which involves the extraction of cholesteryl esters (CE) from lipoproteins without concomitant degradation of their apolipoproteins (Acton *et al.* 1996). Although selective uptake is usually associated with HDL cholesterol, evidence suggests that this pathway may also act on other lipoproteins, such as LDL (Brissette *et al.* 1996 ; Green *et al.* 1991 ; Rhainds *et al.* 2003 ; Swarnakar *et al.* 1999) and oxidized LDL (OxLDL) (Rhainds *et al.* 1999). This selective uptake process is usually associated with the scavenger receptor class B type I (SR-BI). SR-BI is a highly glycosylated cell surface receptor mainly expressed in steroidogenic organs and liver (Acton *et al.* 1996 ; Landschulz *et al.* 1996). Interestingly, it was shown that fibroblasts and adipocytes, which share common precursor cells with the osteoblasts, also express SR-BI (Duong *et al.* 2006 ; Yvan-Charvet *et al.* 2007). This receptor is able to binds native lipoproteins (LDL and HDL), but was initially found as a receptor for maleylated bovine serum albumin (M-BSA) and modified LDL (oxidized or acetylated) (Acton *et al.* 1996 ; Calvo *et al.* 1997). SR-BI is now recognized as a physiological receptor for HDL that mediates bi-directional flux of cholesterol and other lipids between HDL and cells (Brodeur *et al.* 2005 ; Brundert *et al.* 2005 ; Ji *et al.* 1997 ; Out, Hoekstra *et al.* 2004). Although less efficient, an alternative mRNA splicing variant of SR-BI, called SR-BII, differing by an entirely different C-terminal cytoplasmic tail was more recently identified (Webb *et al.* 1998). The cluster of differentiation-36 (CD36) is another SR-B receptor and, as SR-BI, CD36 has the ability to selectively take up CE from HDL but with a much lower efficiency (Connely *et al.* 1999 ; Gu *et al.* 1998). Although CD36 has a broad range of ligands, the physiological role of the CD36 towards lipoproteins is essentially associated to the uptake of OxLDL (Nozaki *et al.* 1995 ; Podrez *et al.* 2000).

The primary aim of the current study was to determine if osteoblastic cells can bind, internalize and metabolize LDL and HDL and thereafter to determine the expression

of the SR-B receptors and related functions in osteoblasts. We also attempted to determine if estradiol associated with lipoproteins could be transferred to osteoblasts. We found that osteoblastic cells can bind, internalize and degrade LDL and HDL and that osteoblasts express scavenger receptors SR-BI, SR-BII and CD36. We also show that osteoblastic cells are able to selectively take CE from LDL and HDL₃ and that SR-B receptors are responsible for this process. We also demonstrate for the first time that LDL and HDL₃ can deliver estradiol to the osteoblastic cell by a selective uptake process.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Materials :

Human (MG-63) and mouse (MC3T3-E1) osteoblast-like cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Normal human osteoblasts (hOB) were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 without phenol was bought from Sigma (St Louis, MO, USA). Glutamine, trypsin, alpha-MEM, penicillin-streptomycin solution and enhanced chemiluminescence substrate were purchased from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Foetal bovine serum (FBS) was purchased from Cansera (Etobicoke, Ontario, Canada). 1,2-[³H]-cholesteryl oleate (50 mCi/mmol) was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Quebec, Canada) and ¹²⁵Iodine (as sodium iodide, 100 mCi/mmol) was bought from ICN Biomedicals (Montreal, Quebec, Canada). 2,4,6,7,16,17-[³H]-estradiol (87 mCi/mmol) was bought from Perkin Elmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario, Canada). Polyclonal antibodies against SR-BI, SR-BII and CD36 were from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA). Goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase was from Chemicon (Temecula, CA, USA). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2. Primary culture of mouse osteoblasts (mOB) :

Mouse osteoblasts (mOB) were isolated from wild type C57BL/6 mice purchased from Charles River (Boston, MA, USA). Briefly, animals were killed accordingly with protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the Université du Québec à Montréal (No. 0507-582-0408) and tibias were retrieved. Thereafter, bone explants were washed free of blood, cut in small fragments and washed 2 times with α -MEM with phenol (α -MEM). These bone pieces were then digested three times with collagenase type I (1 mg/ml in α -MEM) for 20, 20, and 40 min. After, the pieces were washed 2 times with α -MEM supplemented with 10% FBS and then placed in 100 mm culture dishes. Digested bone fragments were cultured until cells outgrowth and reach confluence within 21 to 28 days in culture. At confluence, cells were harvested and seeded at 15 000 cells/cm² in 12-well plates and cultured for 7 days.

2.3. Cell culture :

Human osteoblasts (MG-63 and hOB) and MC3T3-E1 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 without phenol (DMEM-F12) or α -MEM respectively, supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Cells were cultured in 5% CO₂ at 37 °C and were harvested once a week with Trypsin-EDTA solution (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). For experiments, cells were trypsinized, seeded at 2500 cells/cm² (MG-63) or 10 000 cells/cm² (MC3T3-E1 and hOB) in 12-well plates and cultured for 5 days.

2.4. Isolation and radiolabelling of lipoproteins :

Lipoproteins were isolated from human plasma obtained from Bioreclamation (Hicksville, NY, USA). Before the isolation, the plasma was adjusted to 0.01% ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 0.02% sodium azide and 10 μ M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Human LDL (d = 1.025-1.063 g/ml), and HDL₃

(density 1.125-1.21 g/ml) were prepared by ultracentrifugation as described by Brissette *et al.* (1996). Both lipoproteins contained no detectable amount of apoE as assessed by immunoblotting. Lipoproteins were iodinated by a modification (Langer *et al.* 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). Briefly, 1 mCi of sodium ¹²⁵iodide was used to iodinate 2.5 mg of lipoprotein in the presence of 30 nmoles (10 nmoles for HDL₃) of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 100,000 to 250,000 cpm/μg protein. LDL and HDL₃ were labelled with 1,2-[³H]-cholesteryl oleate essentially as described by Roberts *et al.* (1985). Thereafter the labelled lipoproteins were reisolated by ultracentrifugation. The specific activity of lipoproteins labelled in CE ranged from 6,800 to 11,900 cpm/μg protein. For the labelling of LDL and HDL₃ with estradiol, [2,4,6,7,16,17-³H]estradiol (87 Ci/mmol) in 0.5 M HEPES buffer (pH 7.4) was added to 1.5 mg of lipoproteins diluted in 1ml of TBS and incubated under agitation and nitrogen during 24 hours. Labelled lipoproteins were reisolated by ultracentrifugation and the specific activity ranged from 2,000 to 3,500 cpm/μg protein.

2.5. Lipoprotein modification :

LDL preparations were dialysed against TBS to remove EDTA before oxidation. Standardly OxLDL were prepared as described by Lougheed and Steinbrecher (1996). LDL (200 μg of protein/ml in TBS) were incubated with 5 μM CuSO₄ for 20h at 37°C. Oxidation was stopped by the addition of EDTA (final concentration of 100 μM) and butylated hydroxytoluene (40 μM final) and the oxLDL were concentrated to 15-20 mg/ml using Centriplus-100 ultrafiltration devices (Amicon, Oakville, Ont.). Standardly OxLDL typically resulted in a 2.8-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL on 0.5 % agarose/barbital gels. Mildly OxLDL were obtained after 4 h of incubation under similar conditions and showed a 1.5-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL.

2.6. Lipoprotein binding assays :

The binding assays were conducted on cells that were approximately 90% confluent. Cells were washed twice with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 2 h at 4°C with 0-50 µg of protein/ml of ^{125}I -lipoprotein (LDL, OxLDL and HDL₃) in a total volume of 250 µl containing 125 µl of culture medium (2X), 4% bovine serum albumin and 25 mM HEPES, pH 7.4 (total binding). Nonspecific binding was assessed by the addition of 1.5 mg of protein/ml of unlabelled lipoproteins. At the end of the incubation, the cells were washed twice with 1 ml of PBS containing 0.2% BSA (PBS-BSA) followed by two washes with 1 ml of PBS. The cells were then solubilized in 1.5 ml of 0.2 N NaOH. Radioactivity counts in the homogenates were obtained with a Cobra II counter (Canberra-Packard), and cell protein content was determined. Specific binding was obtained by subtracting the non-specific binding of ^{125}I -lipoprotein from the total binding. The curves generated by the specific binding data were transformed into plots of the ratio of cell bound to free ^{125}I -lipoprotein vs cell-bound ^{125}I -lipoprotein by the method of Scatchard (1949). Dissociation constants (K_d) and maximum binding capacities (B_{max}), representing the reciprocal of the slope and the x-axis intercept of the Scatchard plots, respectively were obtained with GraphPad Prism software.

2.7. Competition assays :

Unlabelled HDL₃, LDL and standardly or mildly OxLDL were used as competitors for the association curves with ^{125}I -lipoprotein. To measure association under these conditions, ^{125}I -lipoprotein (20 µg protein/ml) was incubated for 2 h at 37 °C with cells in the presence of increasing concentrations of unlabelled competitors (0-800 µg/ml). At the end of the incubation, cell monolayers were processed as mentioned above. The 100% specific association value was calculated by subtracting the non-specific association data (obtained by the addition of 2 mg of protein/ml of the proper unlabelled lipoprotein) from the total association.

2.8. Cellular lipoprotein association and degradation assays :

Cellular associations of ^{125}I -lipoprotein or ^3H -CE-lipoprotein (20 μg of protein/ml) were measured at 37°C for 4 h in 12-well plates, as for the binding studies, but without HEPES. At the end of the incubation, the dishes incubated with labelled lipoproteins were processed as for the binding studies. Radioactivity counts in the homogenates were obtained with a cobra II gamma-counter (Canberra-Packard) if the cells were incubated with ^{125}I -lipoproteins or with a beta-counter (Wallack-Fisher) if they were incubated with $[^3\text{H}]\text{CE}$ - or $[^3\text{H}]$ -estradiol-lipoproteins. The results are expressed in micrograms of lipoprotein protein per milligram of cell protein. To compare the association of lipoproteins labelled in protein (^{125}I) or in CE (^3H), the association data of ^3H -CE-lipoprotein were estimated as micrograms of protein per milligram of cell protein (apparent uptake). To achieve this, the specific activity of ^3H -CE-lipoprotein was expressed in counts per minute per microgram of lipoprotein protein. The specific association was calculated by subtracting the non-specific association from the total association. Selective uptake of CE is observed when specific $[^3\text{H}]\text{CE}$ - or $[^3\text{H}]$ -estradiol-lipoproteins association minus specific ^{125}I -lipoprotein association is greater than zero. To assess degradation, the cells were incubated with 20 μg of protein/ml of ^{125}I -lipoprotein at 37°C for 16 h. At the end of the incubation, the medium was collected and trichloroacetic acid (TCA) was added to a final concentration of 12%. The degradation was estimated from the non-iodine TCA-soluble fraction of the incubation medium.

2.9. Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) :

Total RNA from osteoblastic cells was isolated using Trizol (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer procedure. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using RT Omniscript Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) with random hexamer primers and PCR were conducted with specific primer sets (human and mouse SR-BI: forward primer 5'

ACAACGACACCGTGTCTTC 3', reverse primer 5'
 GAAGCCTTCGTTGGGTGGGTAGA3'; human SR-BII: forward primer 5'-
 GGGCTCAGGAGTTCTGAATG-3', reverse primer 5'-
 CGACTCGCCGTCTCTTTATC-3'; mouse SR-BII: forward primer 5'-
 TTACCAAGCCGACGAGAAGT-3', mouse SR-BII reverse primer 5'-
 ACCAAGCCAAAGAACACACC-3'; human CD36: forward primer 5'-
 ATCTATGCTGTATTTGAATCCGACGT-3', reverse primer 5'-
 AATAGGTTGACCTGCAGCCGT-3'; mouse CD36: forward primer 5'-
 GTCCTGGCTGTGTTTGGAGG-3', reverse primer 5'-
 CTGTGCCATTAATCATGTCGCA-3'.

2.10. Immunoblotting :

Total proteins of MG-63 and MC3T3-E1 cells were extracted by ice cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% IGEPAL and 60 mM Octylglucoside) containing 1 mM Na_2VO_3 , 0.1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 0.5 mM Benzamidin and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin. Proteins (50 μg) were separated on 10% reducing SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Immunodetections were performed with anti-SR-BI, SR-BII or CD36 polyclonal antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO) followed by enhanced chemiluminescence detection on Kodak Biomax ML film.

2.11. Protein fractionation by discontinuous sucrose gradient :

MG-63 and MC3T3-E1 cells were fractionated by sucrose gradients. Briefly, three 100 mm dishes were washed twice with 10 ml PBS and cells were scraped in 2 ml of 500 mM Na_2CO_3 , pH 11. On ice, cells were disrupted by 30 strokes of a 5 ml tight-fitting glass Dounce homogenizer, three 10-second bursts with a Polytron homogenizer (Brinkman) and three 20-second sonication bursts at 50% maximum power (Branson Sonifier 250). The homogenate was mixed with 2 ml of 85%

sucrose in morpholinoethanesulfonic acid (MES)-buffered saline (MBS), pH 6.5 in a 12 ml ultracentrifuge tube. The top was layered with 4 ml of 35% sucrose in MBS plus 250 mM Na_2CO_3 and 4 ml of 5% sucrose in MBS- Na_2CO_3 . Gradients were centrifuged at 190,000 g for 18 hours at 4°C in an SW41 rotor (Beckman). Twelve 1 ml fractions were collected from the top. Lipid rafts floated at the 5-35% sucrose interface (fractions 4-6). Proteins of fractions 1-12 were precipitated with 21% TCA and suspended in 100 μl 0.2 N NaOH plus 1% SDS for immunoblotting. Fraction 13 (pellet) was suspended in 100 μl MBS, pH 6.5. Aliquots of each fraction (50 μl) were loaded on gels. All fractions were analyzed by immunoblotting for SR-BI, SR-BII, CD36 and caveolin-1.

2.12. Other methods :

Protein content was determined by the method of Lowry (1951) with BSA as standard. Student's t test was used to obtain statistical comparison of the data. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Binding of lipoproteins to osteoblastic cells :

In order to determine the presence of cell surface receptors for lipoproteins on osteoblastic cells, typical binding experiments were conducted using MG-63 and MC3T3-E1 cells. For all ligands, saturation or beginning of saturation was obtained at the highest concentration tested (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (data not shown). The binding parameters (Table 2.1) obtained for ^{125}I -LDL revealed the presence of high-affinity binding sites, as demonstrated by K_d values ranging from $5.5 \pm 0.3 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for MC3T3-E1 to $7.2 \pm 2.2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ for MG-63 cells. To determine the presence of cell surface binding sites corresponding to scavenger receptors in osteoblasts, experiments were also conducted with OxLDL (well known ligands for these receptors). An oxidative modification of the LDL particles diminished significantly its binding

Table 2.1 . Parameters of LDL, modified LDL and HDL₃ binding to MG-63 and MC3T3-E1 cells.

Binding assays of ^{125}I -labelled lipoproteins to the different osteoblastic cells were carried out as described in the Experimental Procedures. Briefly, ^{125}I -lipoproteins (0-50 μg of protein/ml) were incubated with cells at 4°C for 2 h. Nonspecific binding was estimated by adding 1.5 mg of protein/ml of the proper unlabelled lipoprotein and specific binding was calculated by subtracting the nonspecific from the total binding. K_d and B_{max} were determined from Scatchard plots of the specific binding data. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three to four experiments conducted each in duplicate. Statistical differences were determined with a *t*-test. ^a Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with LDL. ^b Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with HDL. ^c Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with MG-63 cells.

Cells	Lipoprotein	K_d (μg of protein/ml)	B_{max} (μg of protein/mg cell protein)
MG-63	LDL	7.18 ± 2.24^b	0.046 ± 0.017
	Mildly OxLDL	$12.71 \pm 2.40^{a,b}$	0.085 ± 0.012^b
	Standardly OxLDL	$12.31 \pm 1.53^{a,b}$	$0.315 \pm 0.058^{a,b}$
	HDL	25.93 ± 5.91^a	0.025 ± 0.005
MC3T3	LDL	5.53 ± 0.26^b	0.060 ± 0.026^b
	Mildly OxLDL	$8.21 \pm 1.06^{a,b}$	0.138 ± 0.038
	Standardly OxLDL	18.03 ± 9.54^a	$0.338 \pm 0.078^{a,b}$
	HDL	$13.60 \pm 2.27^{a,c}$	$0.178 \pm 0.035^{a,c}$

affinity as demonstrated by the increase in K_d values for mildly and standardly oxidized LDL in MG-63 and MC3T3 cells (Table 2.1). In contrast to the LDL binding parameters, a K_d value of $25.9 \pm 5.9 \mu\text{g.ml}^{-1}$ for HDL₃ was obtained, indicating a moderate binding affinity of this lipoprotein for MG-63 cell receptors. Although the affinity of HDL₃ for MC3T3-E1 cells was also diminished comparatively to LDL, ¹²⁵I-HDL₃ affinity was 50% higher for MC3T3-E1 when compared to MG-63 cells. Only comparison of maximum binding capacity (B_{max}) can be established between native and modified LDL, by assuming that their protein molecular mass is identical (550 kDa for native and modified LDL ; 100 kDa for HDL₃). Thus, it is clear that MG-63 cells can bind more modified LDL than native LDL, as demonstrated by a B_{max} value 2 and 7 times more elevated for mildly and standardly OxLDL, respectively. This more elevated binding capacity for modified LDL was also found for MC3T3-E1 cells. However, these last cells can bind 7 times more ¹²⁵I-HDL₃ than MG-63 cells.

3.2. Competition association assay :

Although the binding experiments clearly indicate that the tested lipoproteins can bind osteoblastic cells, these data do not provide information about the specificity of these ligands for the lipoprotein receptors on MG-63 and MC3T3-E1 cells. We therefore conducted competition association assays with ¹²⁵I-LDL or ¹²⁵I-HDL. Both radioactive ligands were efficiently competed (>90%) by their corresponding unlabelled counterpart (Figure 2.1). LDL, mainly recognized to bind to LDLr, seem to share a common binding site with HDL₃ and standardly OxLDL in MG-63 cells, since these 2 ligands displaced approximately 50% of the associated LDL (Figure 2.1A). In contrast a mild oxidation does not modify the association specificity of LDL (Figure 2.1A), indicating that mildly OxLDL conserve their ability to bind the same receptors for native LDL. HDL₃, a well-defined ligand of SR-BI, was efficiently competed by OxLDL (around 60%). This indicates that OxLDL recognized to bind scavenger receptors, can bind in large proportion to a receptor

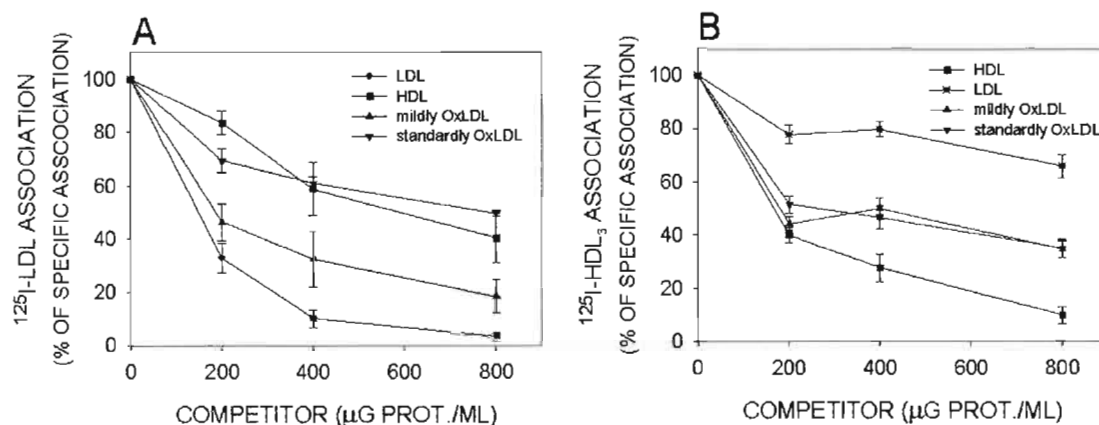


Figure 2.1 : Competition curves of ^{125}I -LDL (A) and ^{125}I -HDL₃ (B) association with MG-63 cells by unlabelled LDL, OxLDL and HDL₃. ^{125}I -lipoproteins at 20 μg protein/ml were incubated with MG-63 cells during 2 h at 37°C in 12-well plates in the presence of the indicated concentrations of either unlabelled LDL, OxLDL and HDL₃. The value without competitor in each experiment was set as 100%. Each point represents the mean \pm S.E.M. derived from three to four experiments conducted each in duplicate.

specific for HDL₃, such as SR-BI. LDL was a less efficient competitor of ¹²⁵I-HDL₃ association comparatively to the reciprocal competition. This may be due to a non-reciprocal cross-competition between HDL and LDL on SR-BI as reported previously (Acton *et al.* 1996). Similar results were obtained with MC3T3-E1 cells (data not shown).

3.3.Mechanisms of lipoprotein uptake and their fate in osteoblastic cells :

Although previous experiments demonstrated that lipoproteins bind cell surface receptors of osteoblastic cells, they do not indicate that these cells are able to process and metabolize the associated lipoproteins. In order to define the fate of lipoproteins in osteoblastic cells, we determined the lipoproteins degradation after incubation periods of 16 h. As shown in Figure 2.2A, ¹²⁵I-LDL-protein was efficiently degraded by MG-63 and mOB cells, whereas hOB and MC3T3-E1 cells are 75% less efficient (Figure 2.2A). ¹²⁵I-HDL₃ were also degraded by all osteoblastic cell types tested. However, degradation was 2 to 3-fold higher for mOB comparatively to MC3T3-E1 cells and human osteoblasts respectively (Figure 2.2A). Thus, these results indicate that osteoblastic cells are able to bind, internalize and metabolize lipoproteins.

As cells can acquire lipoprotein-associated lipids by either holoparticle uptake or selective uptake, we analysed the contribution of each pathway in osteoblastic cells. The cells were incubated with lipoprotein labelled in protein with ¹²⁵I or in lipid moiety with ³H-cholesteryl oleate. CE selective uptake is demonstrated when specific ³H-CE-lipoprotein association minus specific ¹²⁵I-lipoprotein association is greater than zero. Figure 2.2B indicates that ¹²⁵I-LDL significantly associate with osteoblastic cells, and that the level of association is 5-fold higher for MG-63 than for hOB cells. Although LDL protein association was lower (5-fold) in MC3T3-E1 than MG-63 cells, this association remains 2-fold higher comparatively to mOB cells (Figure 2.2B). While our binding assays indicated that MC3T3-E1 cells bind 7 times more HDL₃ than MG-63 cells, protein association of HDL₃ was similar in all osteoblastic cells tested

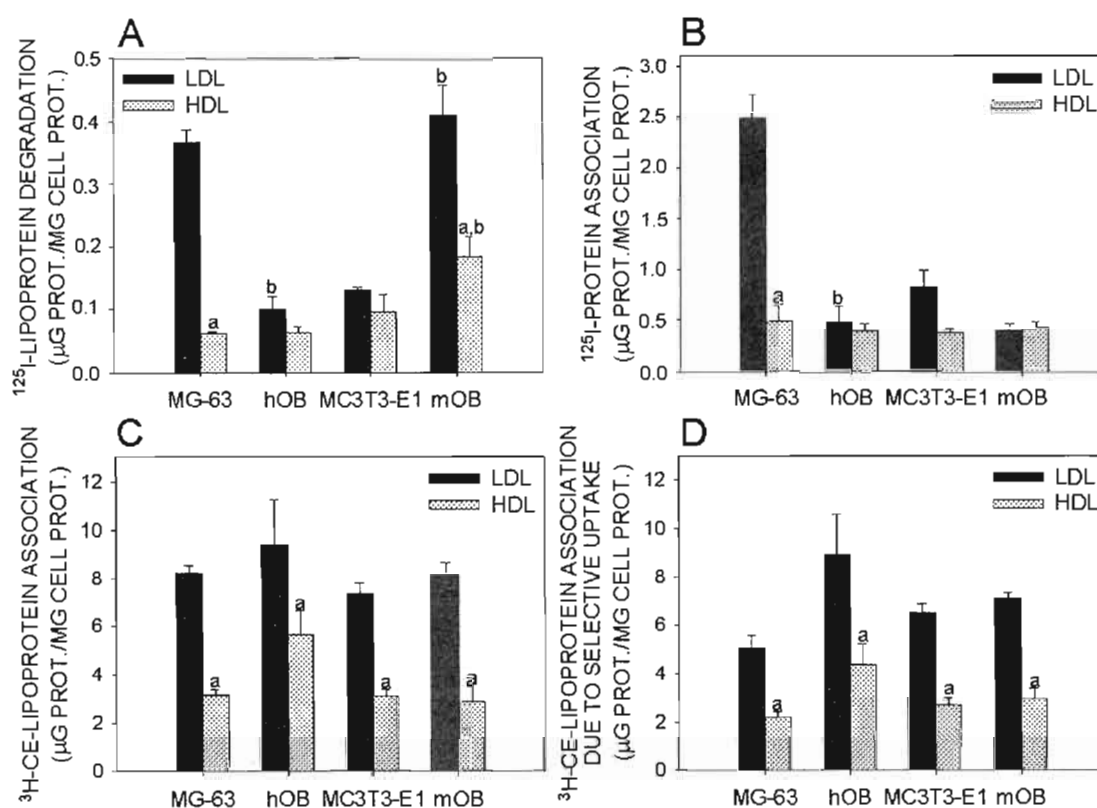


Figure 2.2 : Lipoprotein degradation (panel A), ^{125}I -lipoprotein association (panel B), ^3H -CE-lipoprotein association (panel C) and ^3H -CE-lipoprotein association due to cholesteryl ester selective uptake (panel D) in osteoblastic cells. Radiolabelled lipoproteins (20 μg of protein/ml) were incubated with cells during 4 h (selective uptake) or 16 h (degradation) at 37°C in 12-well plates. Nonspecific radioactive lipoprotein association was determined by the addition of unlabelled lipoprotein at 1.5 mg of protein/ml and subtracted from total association. ^3H -CE-lipoprotein association is calculated as apparent protein association since its specific activity is calculated as cpm/ μg of lipoprotein protein. To determine the amount of CE association due to selective uptake, protein association was subtracted from CE association, both in μg of protein/mg of cell protein. Results are shown as the mean \pm S.E.M. of 4 experiments conducted in duplicate. Statistical differences were determined with a *t*-test. ^a Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with LDL. ^b Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with MG-63 cells for hOB and obtained with MC3T3-E1 cells for mOB.

(Figure 2.2B). This difference may relate to the fact that binding experiments (4°C) score only for the portion of cell surface-associated lipoproteins and not for lipoproteins internalized as in association assays (37°C). On the other hand, ^3H -CE-LDL association was higher (2-3-fold) than the lipid association of HDL₃ in all cell lines used, while no significant difference was found between CE-LDL association obtained for human (MG-63 and hOB) and mouse (MC3T3-E1 and mOB) osteoblasts (Figure 2.2C). The only difference observed is that CE-HDL₃ association is 2-fold higher for hOB comparatively to other cell lines (Figure 2.2C). CE-selective uptake values were also obtained by subtracting protein association data from those of CE. LDL and HDL₃ are good CE donors to all types of cells, although the selective uptake from HDL₃ is 3 times lower than that from LDL (Figure 2.2D). Taken as a whole, selective uptake was similar for all cell lines used at the exception of a higher selective uptake activity from LDL and HDL₃ for hOB cells (Figure 2.2D).

3.4. Expression of scavenger receptors in osteoblastic cells :

The competitive association assays and the occurrence of selective uptake highly suggest the expression of members of SR-B receptor family in osteoblastic cells. We therefore used conventional RT-PCR to detect transcripts for SR-BI, SR-BII and CD36. As shown in Figure 2.3A, a specific band could be identified for each receptor in all cell lines and osteoblast primary cultures tested. Next, by Western blot analysis we determined whether SR-BI, SR-BII and CD36 proteins are expressed in osteoblastic cells. Analysis of cellular protein extracts probed with the antibody directed against SR-BI revealed a band of approximately 82 kDa in all cells examined (Figure 2.3B). The size corresponds with the expected molecular weight of SR-BI and the same protein is detected in our positive control, the HepG2 cell (data not shown). An antibody specific to SR-BII revealed as expected an 82 kDa protein (75 kDa for hOB) and a smaller protein of 55kDa that could be an immature form of SR-BII (Figure 2.3B). Osteoblastic cells also express CD36 as demonstrated by the detection of a signal at 85 kDa, the expected molecular weight of CD36 (Figure

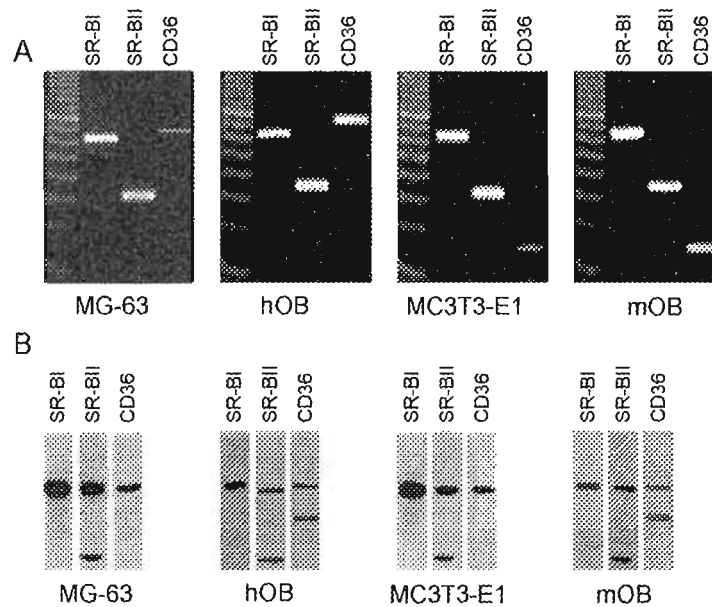


Figure 2.3 : Determination of mRNA and protein expression for SR-BI, SR-BII and CD36 in osteoblastic cells. RT-PCR analysis (A): Total RNA was used for RT-PCR using specific primers for human or mice SR-BI, SR-BII and CD36 as described in Experimental procedures. Representative results are shown for PCR products from MG-63, hOB, MC3T3-E1 and mOB cells separated on a 2% agarose gel. *Western blot analysis (B) :* Total proteins of osteoblastic cells were extracted as described in Experimental procedures. Representative results are shown for 50 μ g of proteins from MG-63, hOB, MC3T3-E1 and mOB cells separated by SDS-PAGE transferred to nitrocellulose and immunodetected with anti- SR-BI, SR-BII or CD36 polyclonal antibody followed by enhanced chemiluminescence detection.

2.3B). Interestingly, a 70 kDa protein is also detected for primary osteoblasts (hOB and mOB) that is likely another glycosylated form of CD36 (Figure 2.3B). These findings indicate that mRNA and protein for both SR-BI/SR-BII and CD36 are present in human and murine osteoblastic cells.

Although these results clearly demonstrated that osteoblastic cells express SR-B receptors, these data give no information about the cellular localization of these proteins. To ensure that these receptors are found at the cellular plasma membrane and thereby functional, we performed fractionation of osteoblast proteins by sucrose gradients in presence of carbonate. The results presented in figure 2.4A show that SR-BI is mainly found in low-density, buoyant fractions (fractions 4-6) of MG-63 and MC3T3-E1 cells. These fractions are referred as low-density membrane rafts or caveolin-rich membranes as demonstrated by the detection of an enrichment of caveolin-1 in these fractions (Figure 2.4D). Figure 2.4A also indicates that SR-BI is also present in high-density fractions. In contrast, SR-BII is mainly found in denser fractions (Figure 2.4B). The antibody used also detects a 110 kDa protein which appears as a nonspecific detection. Finally, CD36 is widely spread over the whole gradient (Figure 2.4C) as an 85 kDa protein and a 70 kDa protein, that could be an immature form of CD36, co-localizes with the 85kDa protein.

2.5. Cross-competition selective uptake assay :

The involvement of SR-B receptors in the selective uptake of CE from LDL and HDL₃ by osteoblastic cells was determined by conducting selective uptake experiments in the presence of different unlabelled SR-B ligands, namely HDL₃, LDL and modified LDL (OxLDL). As shown in figure 2.5A, CE-LDL selective uptake in MG-63 cells was inhibited by 80% and 70% in the presence of unlabelled HDL₃ and standardly OxLDL, respectively. However, the CE-LDL uptake was less inhibited (25%) by the addition of mildly OxLDL. Similar results were obtained with MC3T3-E1 cells (Figure 2.5A). In MG-63 cells, ³H-CE-HDL₃ selective uptake was also

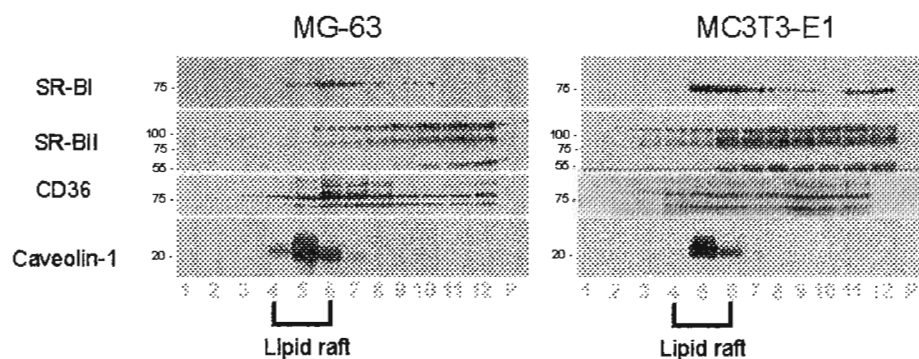


Figure 2.4 : Immunoblotting of MG-63 and MC3T3-E1 cell proteins fractionated by discontinuous sucrose gradient. Osteoblast cell proteins were fractionated with detergent-free sodium carbonate discontinuous 5-40% sucrose gradients as described in Experimental procedures. The 12 gradient fractions were concentrated with TCA and a 50 μ l sample of each fraction was loaded on 12% reducing SDS-polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose and immunodetected with anti- SR-BI, SR-BII, CD36 or caveolin-1 polyclonal antibody followed by enhanced chemiluminescence detection. -P=pellet

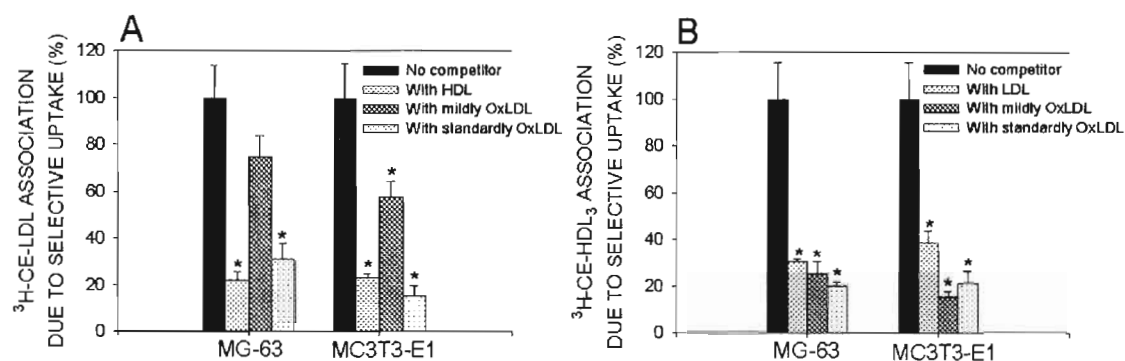


Figure 2.5 : Selective uptakes of ^3H -CE-LDL (panel A) and ^3H -CE-HDL₃ (panel B) in the presence of LDL, OxLDL and HDL₃ by MG-63 and MC3T3-E1 cells. The cells were incubated for 4 h at 37 °C with either 20 μg protein/ml of ^{125}I -lipoprotein or ^3H -CE-lipoprotein with or without 1.5 mg/ml of indicated unlabelled lipoprotein competitor. ^{125}I -lipoprotein protein and ^3H -CE association were measured as described in Experimental procedures. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 experiments conducted in duplicate. * Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained in absence of lipoproteins competitors.

inhibited by SR-B ligands, since more than 70% of CE-HDL₃ selective uptake was competed by addition of LDL or mildly and standardly OxLDL (Figure 2.5B). In MC3T3-E1 cells, the CE-HDL₃ selective uptake was also similarly competed by the presence of unlabelled SR-B ligands (Figure 2.5B).

3.6.Uptake of estradiol associated to lipoproteins (LDL and HDL₃) :

In addition to their role in the transport of cholesterol, lipoproteins are also carriers of estradiol as demonstrated by numerous studies (Gong *et al.* 2003 ; Leszczynski *et al.* 1990 ; Shwaery *et al.* 1997 ; Shwaery *et al.* 1998 ; Tang *et al.* 1997). In order to determine if lipoproteins are capable to deliver estradiol to osteoblastic cells, LDL and HDL₃ were labelled with ³H-estradiol and their protein with ¹²⁵I. Next, cells were incubated with these radiolabelled lipoproteins during 4 hours. Figure 2.6A demonstrates that ³H-estradiol associated with LDL was selectively transferred to osteoblastic cells, according to the higher ³H-E₂-lipoprotein vs ¹²⁵I-lipoprotein associations (data not shown). Although this process was apparent for all osteoblast types used, the results show that MC3T3-E1 cells are more efficient to selectively take up estradiol from LDL (Figure 2.6A). ³H-estradiol selective uptake from HDL₃ (Figure 2.6A) also occurs, but than from LDL in MG-63 and MC3T3-E1 cells. However, primary osteoblasts (hOB and mOB) are equally efficient to take selectively estradiol from LDL and HDL₃ (Figure 2.6A). Therefore, these results clearly demonstrate that estradiol associated with lipoproteins is selectively transferred to osteoblastic cells.

In order to determine if SR-B receptors are responsible for estradiol selective uptake, cross-competition selective uptake assays were conducted with MC3T3-E1 cells. Figure 2.6B shows that E₂-LDL selective uptake was inhibited by 50% and 70% in the presence of unlabelled HDL₃ and OxLDL, respectively. ³H-E₂-HDL₃ selective uptake was also inhibited by SR-B ligands, since more than 60% of E₂-HDL₃ selective uptake was competed by the addition of LDL or OxLDL (Figure 2.6B).

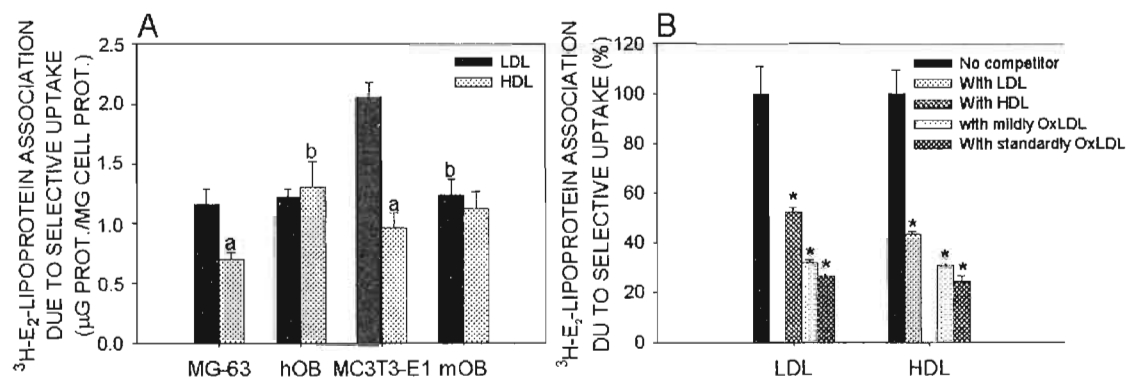


Figure 2.6: Determination of the uptake mechanism of lipoprotein-associated estradiol by osteoblastic cells. *Selective uptake of estradiol (A)* : Radiolabelled lipoproteins (40 μg of protein/ml) were incubated with cells in a BSA-free medium during 4 h at 37°C in 12-well plates in duplicate. Nonspecific radioactive lipoprotein association was determined by the addition of unlabelled lipoprotein at 1.5 mg of protein/ml and subtracted from total association. To determine the amount of E₂ association due to selective uptake, protein association was subtracted from E₂ association, both evaluated in μg of protein/mg of cell protein. Results are shown as the mean \pm S.E.M. of 3 experiments conducted in duplicate. ^a Statistically different (P<0.05) from the result obtained with LDL. ^b Statistically different (P<0.05) from the result obtained with MG-63 cells for hOB and obtained with MC3T3-E1 cells for mOB. *Cross-competition selective uptake assay (B)* : MC3T3-E1 cells were incubated for 4 h at 37°C with either 40 μg protein/ml of ¹²⁵I-lipoprotein or ³H-E₂-lipoprotein with or without 1.5 mg/ml of indicated unlabelled lipoprotein competitor in a BSA-free medium. ¹²⁵I-lipoprotein and ³H-E₂-lipoprotein association were measured as described in Experimental procedures. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 experiments conducted in duplicate. ^{*} Statistically different (P<0.05) from the result obtained in absence of lipoproteins competitors.

Similar results were also obtained with MG-63 cells (data not shown). Thus, these results clearly indicate that SR-B receptors are involved in the selective uptake of estradiol associated with LDL and HDL₃.

4.DISCUSSION

Growing evidence suggests a link between cholesterol and bone metabolism. Indeed, a correlation between the development of atherosclerosis and osteoporosis was reported (Barengolts *et al.* 1998 ; Shiraki *et al.* 1997 ; Uyama *et al.* 1997), suggesting therefore that one or several common factors are responsible for these illnesses. Moreover, it was shown that lipoproteins rich in triglycerides serve to transport lipophilic vitamin K to osteoblasts (Newman *et al.* 2002 ; Niemeier *et al.* 2004). Although these studies highly suggest that lipoproteins are implicated in osteoporosis development and also in osteoblast functions, to date the metabolism of the lipoprotein particles by bone cells remains poorly studied. We therefore undertook the characterization of the metabolism of LDL and HDL₃, 2 important classes of lipoproteins, by osteoblasts and also of the receptors implicated in the processing of these lipoproteins by osteoblastic cells.

Our results indicate that osteoblastic cells (MG-63 and MC3T3-E1) show high-affinity binding sites for LDL (Table 2.1). The data obtained are closely related to those published with HepG2 cells, which revealed that LDL bind to high-affinity sites ($K_d = 1.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, $B_{\text{max}} = 0.088 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) identified in latter cells as the LDLr (Rhainds *et al.* 1999). In contrast to LDL, OxLDL and HDL₃ have a reduced binding affinity for osteoblastic cells, suggesting the presence of binding sites on osteoblastic cells distinct from the LDLr. In accordance, we found that osteoblasts express more binding sites for modified LDL since a higher B_{max} value was obtained for OxLDL. In order to further determine the identity of these receptors, competition association assays were undertaken. As shown in figure 2.1A, HDL₃ and standardly OxLDL

partially displaced the association of LDL particles that are recognized to bind LDLr. As HDL₃ and OxLDL are known ligands for scavenger receptors of class B, it can be speculated that LDL bind to LDLr and also to these scavenger receptors. The expression of these SR-B receptors by osteoblasts is also supported by the reduction of the HDL₃ association when incubated in presence of OxLDL (Figure 2.1B). This indicates that HDL₃ bind in large proportion to receptor(s) for OxLDL, such as SR-B receptors.

As demonstrated by the degradation experiments (Figure 2.2A), these binding sites allow the processing of the associated lipoproteins. Indeed, these experiments clearly demonstrated that osteoblasts are able to internalize and metabolize lipoproteins and that MG-63 and mOB cells efficiently degrade LDL comparatively to hOB and MC3T3-E1 cells. Obviously, the presence of a high-affinity binding site for LDL in MG-63 and MC3T3-E1 cells leading to LDL degradation (i.e. LDLr) could account for this finding. In accordance with the lower efficiency of MC3T3-E1 cells to degrade LDL comparatively to MG-63 cells, we found that in contrary to MG-63, MC3T3-E1 cells express a very low level of LDLr (data not shown). Therefore, the low degradation rate of LDL by hOB cells suggests also that these cells express a low level of LDLr. HDL₃ were also degraded by osteoblasts but the identity(ies) of the receptor(s) involved remain(s) unknown. As mentioned previously, the endocytosis of a lipoprotein followed by its degradation is not the only process for the routing of cholesterol to cells, since a CE selective uptake process was demonstrated in many cell types. To further characterize the molecular mechanism of the uptake of LDL and HDL₃ by osteoblasts, selective uptake experiments were conducted (Figure 2.2B-D). Our results demonstrate for the first time that osteoblasts are able to selectively take up CE from LDL and to a lesser extent from HDL₃. That can be the consequence of the low lipid/protein ratio of HDL₃. This process of selective uptake highlights a new mechanism that allows the delivery of cholesterol to osteoblastic cells.

Until now, only the expression of lipoprotein receptors of the LDLr family (LDLr, VLDL receptor and LDLr related protein (LRP)) had been reported in osteoblasts (Niemeier *et al.* 2004). Our current results demonstrate for the first time that osteoblasts also express SR-B receptors, namely SR-BI, SR-BII and CD36 (Figure 2.3). By the use of sucrose gradients, we have also demonstrated that these SR-B receptors are localized in low-density fractions referred as plasma membrane rafts rich in caveolin as well as in the intracellular compartment (Figure 2.4). This was particularly evident for SR-BI, but also for SR-BII and CD36, although these last two were predominately recovered in the denser fractions corresponding to cytosolic proteins. Overall that information reveals that a significant portion of each of the class B scavenger receptors are at the plasma membrane and likely functional. These receptors appear functional as demonstrated by the binding of well known ligands for SR-BI and CD36, such as OxLDL and HDL₃ (Table 2.1). In addition, the occurrence of CE selective uptake, generally attributed to SR-BI but also to SR-BII and CD36, indicates that these receptors are not only expressed but also are functional in osteoblastic cells. Finally, the demonstration that CE-LDL and CE-HDL selective uptakes were strongly competed by OxLDL (Figure 2.5), a known ligand for SR-B, indicates that these receptors (one or two of them) are actively expressed and responsible for this selective uptake process in osteoblasts.

This first demonstration of the expression of SR-B receptors in osteoblastic cells constitutes a potential novel finding in the comprehension of the correlation between atherosclerosis and osteoporosis. It is well established that LDL become pro-atherogenic after undergoing oxidative modifications suggesting that OxLDL could be also responsible for osteoporosis development. In that regard, OxLDL and oxidative products, as oxysterols, inhibit osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and preosteoblasts in favour of adipogenic differentiation (Mody *et al.* 2001 ; Parhami *et al.* 1997). A recent study by Klein *et al.* (2003) also showed that

OxLDL cause cell death in human osteoblasts. However, the mechanism(s) and pathway(s) (receptor(s)) by which OxLDL act on these cells remain unknown. So, the demonstration of the SR-B receptors in osteoblasts represents a possible mechanism or pathway by which OxLDL may cause their deleterious effects. However, further investigations are needed to determine if SR-B receptors are involved in the induction of osteoporosis under atherogenic conditions.

Although SR-BI is mainly recognized for its role in HDL metabolism, it seems that this receptor is also implicated in the metabolism of chylomicrons. Indeed, it was demonstrated that the down-regulation of SR-BI by a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist increases hypercholesterolemia in apoE deficient mice and restoration of SR-BI expression abolishes the accumulation of apoB-48-carrying remnants in the plasma (Fu *et al.* 2003). Van Berkel group's also demonstrated that association of chylomicrons with hepatocytes from SR-BI deficient mice is greatly reduced compared to hepatocytes from wild-type mice (Out, Kruijt *et al.* 2004). A delayed postprandial response was observed in SR-BI deficient mice (Out, Kruijt *et al.* 2004), while hepatic overexpression of SR-BI in mice leads to a faster postprandial response (Out *et al.* 2005). These studies suggested that SR-BI acts as an initial recognition site for chylomicrons that are subsequently internalized by other receptors like LDLr or LRP. Since it was demonstrated that LRP1 expressed by osteoblasts allow uptake of vitamin K associated with chylomicrons (Niemeier *et al.* 2004), it can be suggested that SR-BI facilitate the uptake of these lipoproteins and vitamin K by osteoblasts, but further investigation are required to resolve that issue.

It is well known that estrogens exert many beneficial effects on bone metabolism, but the plasma physiological carrier for its delivery to osteoblasts has not been elucidated. Although, estrogens are recognized to be transported by sex hormone binding globulin (SHBG) (Hammond *et al.* 1995), it was found that estradiol is also

associated and transported by lipoproteins (Gong *et al.* 2003 ; Leszczynski *et al.* 1990 ; Shwaery *et al.* 1997 ; Shwaery *et al.* 1998 ; Tang *et al.* 1997). Given that SHBG is believed to keep sex steroids inactive and to control the amount of free hormones that enter cells by passive diffusion (Mendel *et al.* 1989), the importance of lipoproteins in the transport of estradiol could take much importance. Although, a recent study demonstrated that in cultured cells, megalin, an endocytic receptor, acts as a pathway for cellular uptake of biologically active androgens and estrogens bound to SHBG (Hammes *et al.* 2005), this lipoprotein receptor pathway for the uptake of estrogen seems to be inexistent or inoperative in bone. Indeed, epidemiological studies revealed a positive correlation between the concentration of SHBG found in the plasma and osteoporosis (Garnero *et al.* 2000 ; Lormeau *et al.* 2004). The results presented here demonstrate for the first time that estradiol incorporated in LDL and HDL₃ are transferred to osteoblastic cells. As the association of ³H-E₂-labelled lipoproteins is higher than that of their protein counterparts (¹²⁵I-lipoproteins), it appears that the uptake of this hormone associated with lipoproteins occurs through a pathway closely similar to the selective uptake of cholesteryl esters, strongly suggesting that at least one of the receptors of SR-B family is implicated in estradiol uptake by osteoblastic cells. In accordance, the inhibition of the selective uptake of estradiol incorporated in lipoproteins by the presence of unlabelled SR-B ligands clearly demonstrated the importance of these receptors in this selective delivery (Figure 2.6B).

Although all of the mechanistic details are not currently known, we propose that the SR-B expression by osteoblasts may play a role in the routing of CE and estradiol to bone cells. As schematically presented in Figure 2.7, circulating lipoproteins (LDL and HDL₃) would bind osteoblasts via SR-B receptors present in plasma membrane lipid rafts that are rich in cholesterol and sphingolipids. Thereafter, lipoproteins selectively transfer their CE and/or estradiol to osteoblastic cells and then would return to the circulation with a reduced content in CE and estradiol. Therefore, these

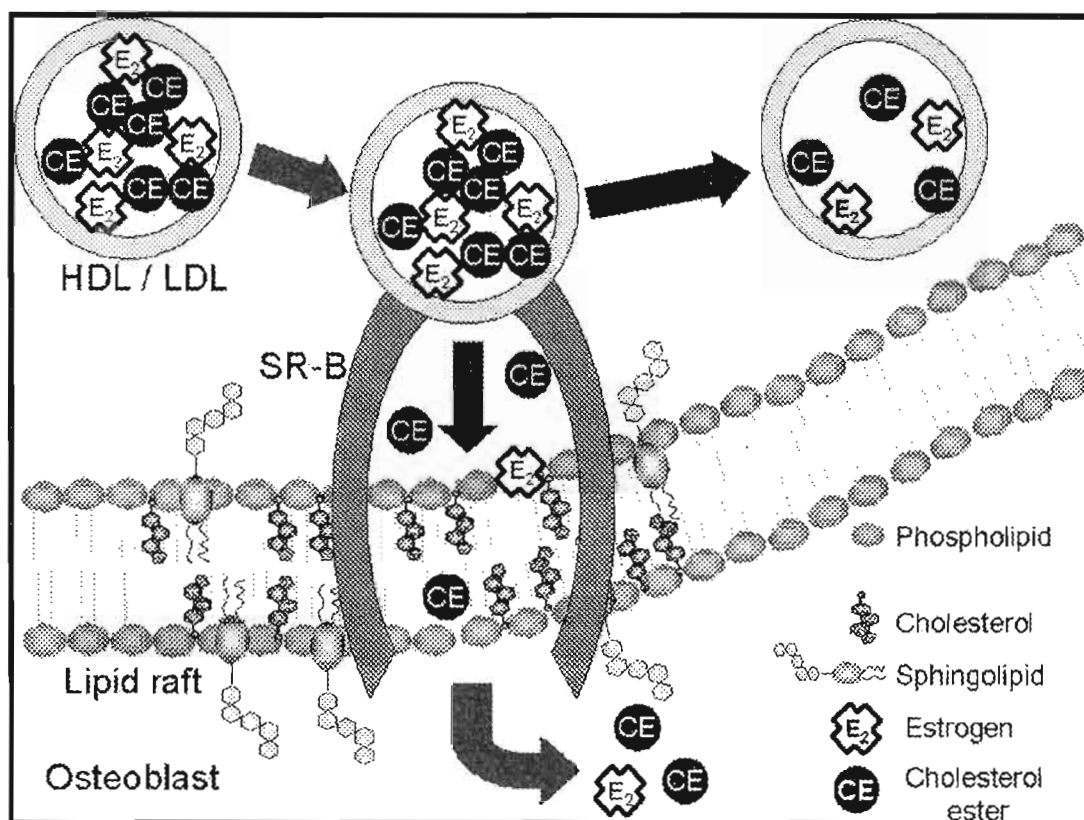


Figure 2.7: Schematic representation of the selective uptake of CE and estradiol associated with lipoproteins by osteoblastic cells. Lipoproteins (LDL and HDL₃) in circulation bind to lipid raft-associated SR-B receptors expressed by osteoblasts. After this binding, by a mechanism that remains to be detailed in osteoblasts, CE and estradiol are transferred from lipoproteins to the cells and thereafter, lipoproteins return to the circulation with a reduced content in CE and estradiol.

results point on an important role of the lipoproteins in the routing of cholesterol and estrogen to bone cells. This constitutes an important finding given the well define importance of estrogen in bone metabolism. However, more investigations are needed to determine the physiological importance of this estradiol delivery mechanism in the osteoblast functions.

In summary, this study demonstrated that osteoblastic cells express lipoprotein binding sites involved in the uptake and metabolism of LDL and HDL₃. It also showed that osteoblasts express SR-BI, SR-BII and CD36 and that these lipoprotein receptors are largely implicated in the metabolism of LDL and HDL₃ as evidenced by the presence of the selective uptake mechanism. Finally, this study demonstrated that estradiol associated with lipoproteins is selectively transferred to osteoblastic cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

CHAPITRE III

Influence of oxidized LDL on the viability of osteoblastic cells.

**Mathieu R. Brodeur¹, Louise Brissette², Louise Falstra²,
Pascale Ouellet² and Robert Moreau¹**

¹Laboratoire du métabolisme osseux, ²Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines,

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique, qui fut accepté pour publication dans la revue *Free Radical Biology and Medicine*, est le résultat d'un travail d'équipe. Ainsi, les cultures cellulaires, l'oxydation des LDL, les essais de dégradation, d'association protéique et lipidique, les essais MTT, les expériences d'externalisation de la phosphatidylsérine, d'incorporation de thymidine, de compte cellulaire, de fragmentation d'ADN, de marquage à l'acridine orange ont été réalisés par l'auteur de cette thèse (M. Brodeur). Les résultats concernant l'oxydation des LDL par les cellules ostéoblastiques (Figure 3.8) sont le résultat du travail de Pascale Ouellet. Le marquage des lipoprotéines a été effectué par Louise Falstra qui a également contribué en assurant le maintien des cellules HepG2 utilisées pour caractériser la capacité de différents types cellulaires à oxyder les LDL (Figure 3.8). J'ai écrit le manuscrit et réalisé les figures et fait les corrections en fonction des commentaires judicieux de Louise Brissette et Robert Moreau. Ces deux derniers ont également contribué en assurant les supports financier et intellectuel essentiels à la réalisation d'un tel travail.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases have recently been mentioned as potential risk factors for osteoporosis development. Although, it is poorly understood how these two pathologies are related, it is a known fact that oxidized low density lipoproteins (OxLDL) constitute potential determinants for both of them. The current study investigated the metabolism of OxLDL by osteoblasts and its effect on osteoblastic viability. The results obtained show that OxLDL are internalized but not degraded by osteoblasts while they can selectively transfer their CE to these cells. It is also demonstrated that OxLDL induce proliferation at low concentrations but cell death at high concentrations. This reduction of osteoblast viability was associated with lysosomal membrane damage caused by OxLDL as demonstrated by acridine orange re-localization. Accordingly, chloroquine, an inhibitor of lysosomal activity, accentuated cell death induced by OxLDL. Finally, we demonstrate that osteoblasts have the capacity to oxidize LDL and thereby potentially increase the local concentration of OxLDL. Overall, the current study confirms the potential role of OxLDL in the development of osteoporosis given its influence on osteoblastic viability.

1.INTRODUCTION

The bone is a living tissue that is continuously being remodelled. This remodelling process implies the breaking down of the bone tissue by the osteoclasts, followed by the formation of a new bone tissue accomplished by osteoblastic cells (Rodan *et al.* 2000). Osteoblasts are also involved in the regulation of osteoclastic activity, given their capacity to secrete a variety of factors necessary for the regulation of osteoclasts formation and activity such as the macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (Kodama *et al.* 1991) and the osteoprotegerin (OPG) (Akatsu *et al.* 1998 ; Udagawa *et al.* 2000). Adequate osteoblastic proliferation, differentiation, secretory functions

or rate of apoptosis are therefore clearly essential not only for bone formation but also for the regulation of bone resorption processes.

A number of epidemiological studies (Barengolts *et al.* 1998 ; Shiraki *et al.* 1997 ; Uyama *et al.* 1997) have found relationships between atherosclerosis and osteoporosis, suggesting that they possess one or several contributory factors in common. One hallmark of cardiovascular diseases is the fact that increased plasma concentrations of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol are directly related to an increased risk of developing coronary artery diseases (Castelli *et al.* 1977). Interestingly, bone metabolism also appears to be affected by blood cholesterol levels, given the fact that individuals with lower bone density and osteoporosis also present higher lipid levels (Barengolts *et al.* 1998 ; Laroche *et al.* 1994 ; Uyama *et al.* 1997). Other pieces of evidence suggesting a possible role of blood cholesterol in bone metabolism regulation include the observation of reduced bone formation in atherosclerosis-susceptible C57BL/6 mice maintained under an atherogenic high-fat diet (Parhami *et al.* 2001), and the fact that lipid-lowering agents (statins), which are widely used to lower circulating levels of cholesterol and to prevent atherosclerosis, promote bone formation and are associated with a marked reduction in fractures (Edwards *et al.* 2000 ; Meier *et al.* 2000 ; Schoofs *et al.* 2004). However, both observations and clinical studies on this topic generated conflicting results and the beneficial effect of statins on bone metabolism remains therefore under debate (Rizzo *et al.* 2004).

Although the importance of cholesterol in the development of osteoporosis has been highlighted, it remains unknown how lipids can affect bone metabolism. Given that it is well established that LDL become pro-atherogenic after undergoing oxidative modifications (Steinberg *et al.* 1997), oxidized LDL (OxLDL) would be expected to be also responsible for osteoporosis. In this regard, some studies have indicated that OxLDL can affect the differentiation of cells towards an osteoblastic phenotype.

Indeed, OxLDL and oxidative products inhibit osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and preosteoblast in favour of an adipogenic differentiation (Mody *et al.* 2001 ; Parhami *et al.* 1991). A recent study by Klein *et al.* showed that OxLDL caused cell death in human osteoblasts (Klein *et al.* 2003). The possible implication of OxLDL in the development of osteoporosis was further highlighted by our previous study, which demonstrated that osteoblastic cells express binding sites for OxLDL (Brodeur *et al.* 2008).

It is well established that an oxidation of LDL results in their loss of interaction with the LDL receptor (LDLr). However, OxLDL is a known ligand for members of the scavenger receptor family such as the scavenger receptor type B class I (SR-BI) and the cluster of differentiation-36 (CD36) (Acton *et al.* 1996 ; Nicholson *et al.* 1995). In contrast to the well-defined endocytosis and degradation of the entire LDL particle by the LDLr (Brown *et al.* 1986 ; Goldstein *et al.* 1974), SR-B receptors are recognized to mediate cellular lipid uptake from lipoproteins via a selective uptake pathway that implies the extraction of the cholesterol esters (CE) from the lipoproteins without a concomitant degradation of their apolipoproteins (Acton *et al.* 1996). Although selective uptake is usually associated with HDL cholesterol, increasing evidence is suggesting that this pathway may also act on other lipoproteins such as LDL (Brissette *et al.* 1996 ; Green *et al.* 1991) and OxLDL (Rhainds *et al.* 1999). In addition to their selective uptake ability, SR-B receptors have shown to possess the capacity to take up OxLDL by an endocytosis process (Gillotte-Taylor *et al.* 2001 ; Nozaki *et al.* 1995 ; Podrez *et al.* 2000).

The aims of the current study were 1) to define the metabolism of OxLDL by osteoblasts, 2) to evaluate the effects of these modified lipoproteins on osteoblast viability and 3) to determine if osteoblastic cells possess the capability to oxidize LDL. The results obtained show that osteoblasts can selectively take up CE from OxLDL and degrade OxLDL but with lower efficiencies than for LDL. It is also

revealed that a low concentrations of OxLDL increases viability and proliferation of osteoblasts whereas a high concentration of OxLDL reduces viability, a phenomenon probably correlated with the low capacity of osteoblasts to degrade these oxidized lipoproteins that could induced lysosomal membrane damage. Finally, we also demonstrate that osteoblasts are able to oxidize LDL. Overall, the present study confirms the potential role of OxLDL in the development of osteoporosis.

2.EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Materials :

Human (MG-63) and mouse (MC3T3-E1) osteoblast-like cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 without phenol was bought from Sigma (St Louis, MO, USA). Glutamine, trypsin, alpha-MEM, penicillin-streptomycin solutions were purchased from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ont. Canada). Foetal bovine serum (FBS) was purchased from Cansera (Etobicoke, Ont., Canada). 1,2-[³H]-cholesteryl oleate (50 mCi/mmol) was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Quebec) and ¹²⁵Iodine (as sodium iodide, 100 mCi/mmol) was bought from ICN Canada (Montreal, Quebec). [³H]-thymidine (37 mCi/mmol) was bought from Perkin Elmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario, Canada) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide (MTT), orange acridine and chloroquine were purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada).

2.2. Osteoblast cell culture :

MG-63 and MC3T3-E1 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 without phenol (DMEM-F12) or alpha-MEM with phenol (α -MEM), respectively. These medias were supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Cells were cultured in 5% CO₂ at 37 °C and were harvested once a week with Trypsin-EDTA

(Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). For experiments, cells were trypsinized, seeded at 2500 cells/cm² (MG-63) or 10 000 cells/cm² (MC3T3-E1) and cultured for 5 days prior to the assays.

2.3. Isolation and radiolabelling of lipoproteins :

Lipoproteins were isolated from human plasma obtained from Bioreclamation (Hicksville, NY). Before the isolation, the plasma was adjusted to 0.01% ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 0.02% sodium azide and 10 μ M phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Human LDL ($d = 1.025$ - 1.063 g/ml) was prepared by ultracentrifugation as described by Brissette *et al.* (1996). They were iodinated by a modification (Langer *et al.* 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). Briefly, 1 mCi of sodium ¹²⁵iodide was used to iodinate 2.5 mg of LDL in the presence of 30 nmoles of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 100,000 to 250,000 cpm/ μ g protein. LDL was labelled with 1,2-[³H]-cholesteryl oleate essentially as described by Roberts *et al.* (1985). Thereafter the labelled LDL were reisolated by ultracentrifugation. The specific activity of LDL labelled in CE ranged from 6,800 to 11,900 cpm/ μ g protein.

2.4. Lipoprotein modification :

LDL preparations were dialysed against TBS to remove EDTA before oxidation. Standardly OxLDL (S-OxLDL) were prepared as described by Loughheed and Steinbrecher (1996). LDL (200 μ g of protein/ml in TBS) were incubated with 5 μ M CuSO₄ for 20h at 37°C. Oxidation was stopped by the addition of EDTA (final concentration of 100 μ M) and butylated hydroxytoluene (40 μ M final) and oxLDL were concentrated to 15-20 mg/ml using Centriplus-100 ultrafiltration devices (Amicon, Oakville, Ont.). S-OxLDL (S-OxLDL) typically resulted in a 2.8-fold increase in the

electrophoretic mobility relative to native LDL on 0.5 % agarose/barbital gels. Mildly OxLDL (M-OxLDL) were obtained after 4 h of incubation under similar conditions and showed a 1.5-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL.

2.5. Oxidation of LDL by MG-63 cells :

After MG-63 cells reached confluence in 12-well plates, culture medium was removed and the cells were then incubated with 1 ml DMEM-F12 per well containing 250 µg/ml LDL for 24 h. Thereafter, the LDL-containing medium was removed and the amount of oxidized lipids in the medium was assessed for TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) using the lipid peroxidation assay kit (Calbiochem) according to the manufacturer procedure.

2.6. Lipoprotein cell association and degradation assays :

Cell association of ^{125}I -lipoprotein or ^3H -CE-lipoprotein (20 µg of protein/ml) was measured at 37°C for 4 h in 12-well plates. Cells were washed twice with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in a total volume of 250 µl containing 125 µl of culture medium (2X), 4% bovine serum albumin, pH 7.4 (total binding). Nonspecific association was assessed by the addition of 1.5 mg of protein/ml of unlabelled lipoproteins. At the end of the incubation the cells were washed twice with 1 ml of PBS containing 0.2% BSA (PBS-BSA) followed by two washes with 1 ml of PBS. The cells were then solubilized in 1.5 ml of 0.2 N NaOH. Radioactivity counts in the homogenates were obtained with a cobra II gamma-counter (Canberra-Packard) if the cells were incubated with ^{125}I -lipoproteins or with a beta-counter (Wallack-Fisher) if they were incubated with [^3H]CE-lipoproteins. The results are expressed in micrograms of lipoprotein protein per milligram of cell protein. To compare the association of lipoproteins labelled in protein (^{125}I) or in CE (^3H), the association data of ^3H -CE-lipoprotein were estimated as micrograms of protein per milligram of cell protein (apparent uptake). To achieve this, the specific activity of

^3H -CE-lipoprotein was expressed in counts per microgram of lipoprotein protein. The specific association was calculated by subtracting the non-specific association from the total association. CE selective uptake is demonstrated when specific [^3H]CE-lipoprotein association minus specific ^{125}I -lipoprotein association is greater than zero. To assess degradation, the cells were incubated with 20 μg of protein/ml of ^{125}I -lipoprotein at 37°C for 8 h. At the end of the incubation, the medium was collected and trichloroacetic acid (TCA) was used at a final concentration of 12%. The degradation was estimated from the incubation medium as the non-iodine TCA-soluble fraction.

2.7. MTT activity and proliferation assays :

MTT activity was determined in 96-well plates (Sarstedt) by microtiter tetrazolium assay after incubation of native LDL or OxLDL during 24, 48 or 72 h in DMEM-F12 supplemented with 2% of human serum deficient in lipoproteins (LPDS). Briefly, MTT reagent was added to the media at a final concentration of 0.5 mg/ml. Four hours later, formazan crystals generated by cellular reduction of the MTT reagent were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) for 30 min at 37°C and the absorbance was determined at 575nm. Results are expressed as the percentage of MTT values of treated versus control conditions. *Thymidine incorporation* : MG-63 cells were seeded in 6-well plates and incubated with native LDL or OxLDL in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. ^3H -thymidine (37 kBq) was added during the last 2 h of the incubation period. The medium was removed, the cell layer was washed once with PBS, and the cells were trypsinized. The cells were pelleted by low speed centrifugation (1,000g for 10 min), washed twice with 1 ml PBS, and resuspended in lysis buffer (0.5 M NaOH). Following a 30 min incubation at 37°C, the solubilized cell lysates were cooled in an ice bath, and then an equal volume of ice-cold 10% TCA was added to precipitate the DNA. The precipitate DNA was washed once with 5% TCA and solubilized in 0.1 N NaOH. Radioactivity counts were obtained with a

beta-counter (Wallack-Fisher). *Cell counts*: MG-63 cells were seeded in 6-well plates and incubated with native LDL or OxLDL in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. After 24, 48 and 72 h, cells were trypsinized and counted with a hemacytometer.

2.8. Cell death assays :

Annexin-V staining : MG-63 cells seeded in 6-well plates were incubated with LDL or OxLDL (200 $\mu\text{g/ml}$) in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. After 24 and 48 h, floating and trypsinized adherent cells were collected by centrifugation at $250\times g$ for 5 min. Cells were washed with PBS and then incubated with 2 μg of propidium iodide (PI) and 10 μl of FITC-Annexin V per ml (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) during 15 min at 4°C . At the end of incubation, 400 μl of cold PBS were added and cellular FITC-Annexin V and PI fluorescences were detected by using a fluorescence-activated cell sorter (FACScan, Becton Dickinson, Mississauga, Canada) and data were analyzed with Cell Quest software (Becton Dickinson). Cells negative for PI uptake and positive for FITC-Annexin V were considered apoptotic.

DNA fragmentation : MG-63 cells were incubated with LDL or OxLDL (200 $\mu\text{g/ml}$) in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. After 72 h, adherent and nonadherent cells were collected, washed twice with cold PBS, and resuspended in lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM EDTA and 0.5% triton X-100. After a centrifugation for 5 min at $1600g$, the supernatant was collected, and the extraction was repeated with the same amount of lysis buffer. The supernatants were brought to 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) and treated for 2 h with RNase A (final concentration of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) at 37°C , followed by digestion with proteinase K (final concentration of 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) for 2 h at 56°C . Supernatants were extracted with 1:1 (v/v) phenol/chloroform. After addition of 1/10 volume of 3 M ammonium acetate, the DNA was precipitated with 2 volumes of absolute ethanol. DNA was recovered by centrifugation at $12\ 000g$ for 10 min and dissolved in Tris-EDTA buffer and applied to a 2% agarose gel.

2.9. Evaluation of lysosomal integrity by acridine orange staining :

MG-63 cells exposed for 24 h to LDL or OxLDL (200 µg/ml) were vitally stained with acridine orange (AO) solution at 5 µg/ml in complete medium for 30 min at 37°C. AO is a lysosomotropic weak base and a metachromatic fluorochrome showing red fluorescence at high and green fluorescence at low concentrations. The intensities of red and green AO fluorescence were then examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) with a Plan-Apochromatic 60X oil N.A. 1.4 objective lens.

2.10. Other methods :

Protein content was determined by the method of Lowry (1951) with BSA as standard. Student's t or ANOVA tests were used to obtain statistical comparison of the data. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3.RESULTS

3.1. OxLDL metabolism by osteoblastic cells :

We previously demonstrated that osteoblastic cells express scavenger receptors of class B (SR-BI, SR-BII and CD36) and bind OxLDL (Brodeur *et al.* 2008). To further determine the metabolism of OxLDL by osteoblasts, we analysed by selective uptake experiments the fate of OxLDL after their binding to osteoblasts. To this end, the cells were incubated separately with lipoprotein labelled in their protein moiety with ^{125}I and in their lipid moiety with ^3H -cholesteryl oleate. CE selective uptake is demonstrated when the calculated values from specific ^3H -CE-lipoprotein association minus specific ^{125}I -lipoprotein association are greater than zero. Figure 3.1A indicates that ^{125}I -OxLDL association was 2-4-fold lower than ^{125}I -LDL association in human MG-63 cells. In contrast, the association of ^{125}I -OxLDL was rather equal to or higher than ^{125}I -LDL association in murine MC3T3-E1 cells and globally similar to the

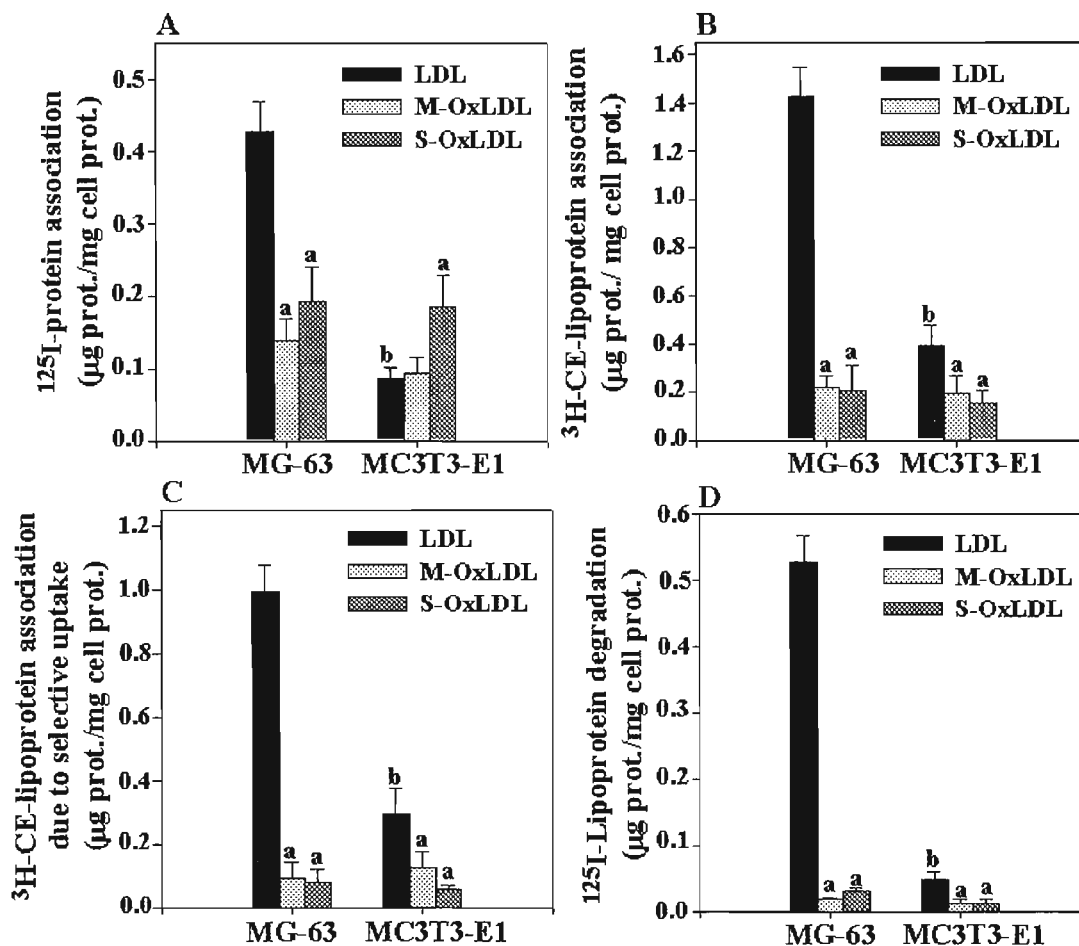


Figure 3.1: ^{125}I -lipoprotein association (panel A), ^3H -CE-lipoprotein association (panel B), ^3H -CE-lipoprotein association due to cholesteryl ester selective uptake (panel C) and lipoprotein degradation (panel D) in MG-63 and MC3T3-E1 cells. Cells were incubated with radiolabeled lipoproteins (20 μg of protein/ml) for 4 h (selective uptake) or 8 h (degradation) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 12-well plates. Nonspecific association of radioactive lipoproteins was determined by the addition of unlabeled lipoproteins at 1.5 mg of protein/ml and subtracted from total association. ^3H -CE-lipoprotein association is calculated as apparent protein association since its specific activity is calculated as cpm/ μg of lipoprotein protein. To determine the amount of CE association due to selective uptake, protein association was subtracted from CE association, both in μg of protein/mg of cell protein. Results are shown as the mean \pm S.E.M. of 4 experiments conducted in duplicate. Statistical differences were determined with a *t*-test. ^a Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with LDL. ^b Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with MG-63 cells.

association levels obtained with MG-63. The main difference between both types of cells is that ^{125}I -LDL association was approximately 5-fold lower in MC3T3-E1 cells compared to MG-63 cells. In accordance, we found by Western blot analysis that in contrary to MG-63, MC3T3-E1 cells express a very low level of LDLr (data not shown). ^3H -CE association from OxLDL was 6.5 times lower than CE association of LDL obtained in human MG-63 cells (Figure 3.1B). Similarly, the results presented in figure 3.1B indicate that ^3H -CE-OxLDL association half that of CE-LDL association in murine MC3T3-E1 cells. Again, CE association from OxLDL was similar in both cell types and CE-LDL association in MC3T3-E1 cells was 4 times lower than in MG-63 cells. CE-selective uptake results, obtained from protein- and CE-lipoprotein data, indicate that LDL was a good CE donor to both types of cells, although the selective uptake is 3 times higher in MG-63 than in MC3T3-E1 cells. However, oxidative modification of LDL appears to affect the ability of this lipoprotein to transfer CE to osteoblastic cells, as demonstrated by a reduced selective uptake activity from OxLDL (reduction of 60-90%) in the two cell types tested (Figure 3.1C). These results suggest that osteoblasts of different levels of differentiation have the ability to take up OxLDL and that osteoblastic cells take up OxLDL by holoparticle uptake and also by performing CE selective uptake.

Although the previous results indicated that osteoblasts are capable of internalizing OxLDL, no information was given about the capacity of osteoblasts to process and metabolize the associated lipoproteins. We further defined the fate of OxLDL in osteoblastic cells by conducting degradation experiments. As we previously reported (Brodeur *et al.* 2008), ^{125}I -LDL-protein is efficiently degraded by both MG-63 and MC3T3-E1 cells (Figure 3.1D), although MC3T3-E1 cells are approximately 90% less efficient than MG-63 cells (Figure 3.1D). Comparatively to LDL, modified LDL was very poorly degraded by MG-63 and MC3T3-E1 cells (Figure 3.1D), since degradation values obtained for OxLDL were 80-95% lower comparatively to LDL

(Figure 3.1D). Thus, overall for both CE-selective uptake and degradation, LDL metabolism by osteoblasts is greater than for OxLDL.

3.2.Effect of LDL and OxLDL on the MTT reduction activity by osteoblastic cells :

Given the similarity in the ability of MG-63 and MC3T3-E1 cells to metabolize OxLDL, we next used only MG-63 cells to study the effects of native and oxidized LDL on the viability of osteoblastic cells. The results presented in Figure 3.2A show that increasing concentrations of native LDL do not affect the MTT activity of MG-63 cells upon 72 h of treatment. However, a mild oxidative (M-OxLDL) modification of LDL increases the MTT activity of these cells (Figure 3.2B), reaching approximately 50% when compared to control cells (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 20 $\mu\text{g/ml}$). This increased MTT activity in presence of M-OxLDL was seen at all concentrations, at the exception of the higher concentration used (250 $\mu\text{g/ml}$) that did not significantly affect the MTT activity of MG-63 cells when compared to control condition. These effects of M-OxLDL were apparent after a treatment of 24 h and were maintained during 72 h. Similarly, after a treatment of 24 h, S-OxLDL also induced an increase of the cellular MTT activity, but in contrast to M-OxLDL, this enhanced MTT activity was only seen at low concentrations (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 20 $\mu\text{g/ml}$ to 100 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 3.2C). Higher concentrations rather caused a statistical decrease in the MTT activity of MG-63 cells (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 200 $\mu\text{g/ml}$). This loss of MTT activity caused by S-OxLDL progressively increased with the time of exposure, reaching a 50% reduction after 48 h of exposure to 150 $\mu\text{g/ml}$ of S-OxLDL. After 72 h, only 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of these modified LDL caused an increase in the cellular MTT activity while other concentrations used did not affect or significantly reduced MTT activity.

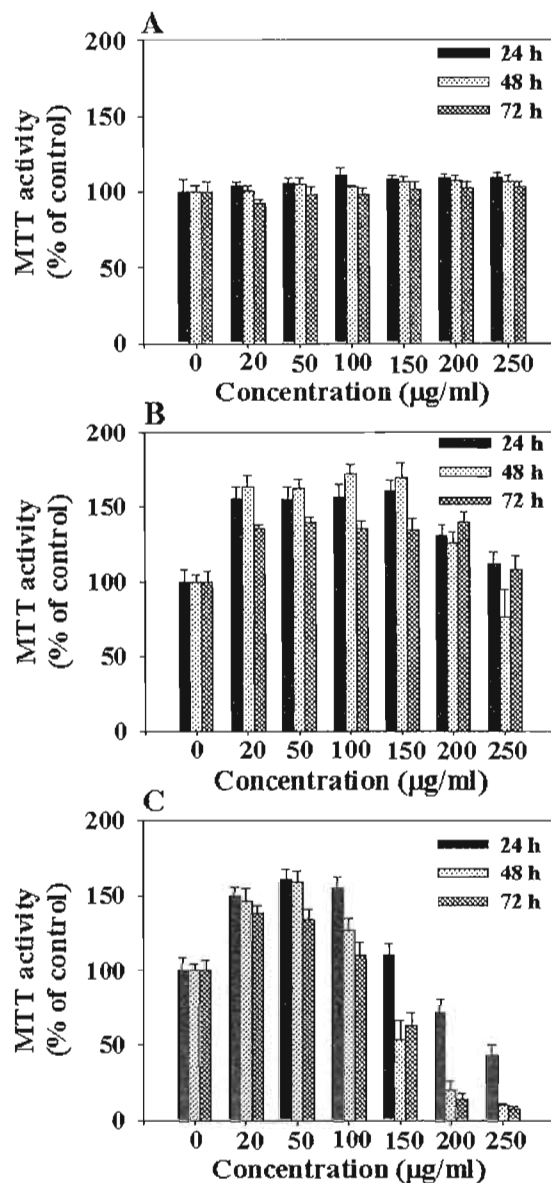


Figure 3.2 : Effect of native LDL and oxidized LDL on osteoblastic MTT activity. MG-63 cells were incubated with increasing concentrations (20-250 µg of protein/ml) of native LDL (A) M-OxLDL (B) and S-OxLDL (C) during 24, 48 and 72 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. Cell viability was determined by MTT assay and is expressed as the mean \pm S.E.M. of 9 experiments conducted each in triplicate. Statistical differences were determined with a one-way Anova.

3.3. The stimulation of osteoblast proliferation by OxLDL :

To further define if the increased cellular MTT activity caused by OxLDL represents a proliferative effect of these modified lipoproteins on osteoblastic cells, we performed ^3H -thymidine incorporation assays (Figure 3.3A). Results show that OxLDL increase DNA synthesis since after 24 and 48 h, thymidine incorporation was significantly increased by 40% comparatively to control cells. In accordance with MTT assays revealing a dual effect of OxLDL on osteoblast viability (proliferation and cell death), this increased DNA synthesis was not apparent after a 72 h-treatment with M-OxLDL (Figure 3.3A). Moreover, results indicated that after such a period of time, S-OxLDL decreased by 40% ^3H -thymidine incorporation (Figure 3.3A). In view to determine if this enhanced DNA synthesis resulted in increased cell number, cell count assays were conducted. MG-63 cells seeded in 6-well plates were incubated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of native LDL or OxLDL. After 24, 48 and 72 h of incubation, cells were trypsinized and hemacytometer cell counts were performed. The number of cells was significantly increased by 20% in the presence of OxLDL when compared to control treatment (Figure 3.3B). This increase in cell number caused by OxLDL was already apparent after 24 h and was sustained upon longer treatment. In accordance with MTT assays, the results presented in figure 3B demonstrate that, at any time, native LDL had no effect on ^3H -thymidine incorporation and cell number when compared to cells incubated without lipoprotein. Therefore, these results indicate that low concentrations of OxLDL induce osteoblast proliferation.

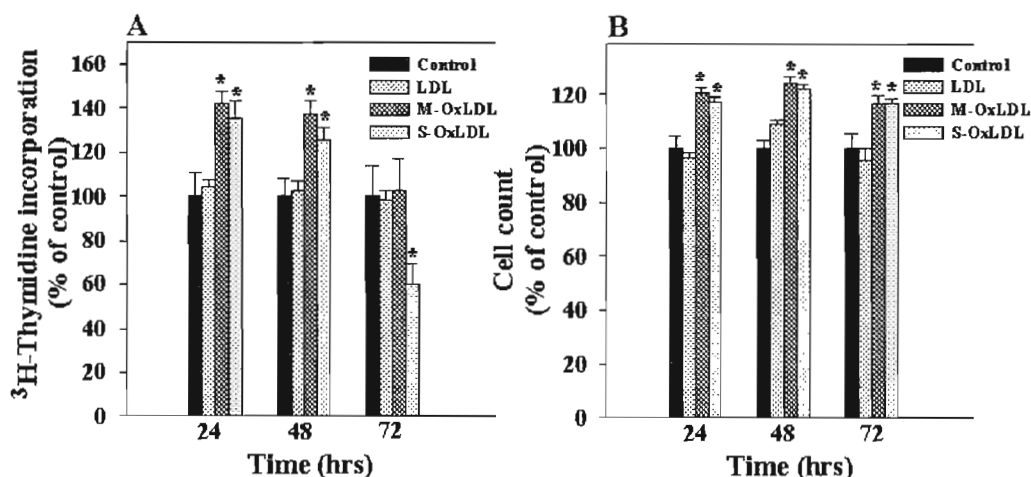


Figure 3.3 : OxLDL induced proliferation of MG-63 cells. MG-63 cells seeded in 6-well plates were treated with 20 μ g of protein/ml of native LDL, M-OxLDL and S-OxLDL during 24, 48 and 72 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. ³H-thymidine incorporation (A) : The cells were pulsed with 0.1 μ Ci/mL ³H-thymidine during the last 2 h of incubation and its incorporation was quantified by scintillation counting. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 5-8 experiments conducted each in triplicate. Statistical differences were determined with a *t*-test. * Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained from cell incubated without lipoproteins. Cell count (B) : Cell counts were performed on trypsinized cells and each value represents the mean \pm S.E.M. of 5 experiments conducted each in triplicate. Statistical differences were determined with a paired *t*-test. * Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained from cell incubated without lipoproteins.

3.4. Osteoblastic cell death induction by OxLDL :

In view to further characterize if the decreased cellular MTT activity caused by OxLDL represents an apoptotic process, we incubated MG-63 cells with native LDL or OxLDL (200 µg/ml) for 24 and 48 h and thereafter cells were labelled with annexin-V/FITC and propidium iodide (PI). The results presented in figure 3.4A demonstrate that S-OxLDL induced externalization of phosphatidylserine (PS) residues since after 24 h approximately 50% of cells treated with S-OxLDL move toward lower right quadrant, which is characteristic of an early apoptotic process. Moreover, this apoptosis induced by S-OxLDL was accentuated with time of exposure since after 48 h all cells are annexin-V positive and gradually move toward the upper right quadrant, typical of a late apoptotic or necrotic stages (Figure 3.4A). Similarly, M-OxLDL also induced apoptosis event but a longer exposure time was required, since annexin-V positive cells were apparent only after 48 h (Figure 3.4A). Results also demonstrated that native LDL did not induce apoptosis given that cells were mainly negative for annexin-V labeling (Figure 3.4A). Moreover, we demonstrate in figure 3.4B that incubation of MG-63 cells with S-OxLDL during 72 h induced DNA fragmentation as revealed by DNA laddering, a sign of later stage of apoptosis. DNA fragmentation was not observed in cells treated with LDL and M-OxLDL (Figure 3.4B).

3.5. Impact of OxLDL on lysosomal membrane stability :

The low ability of osteoblastic cells to degrade OxLDL suggests that lysosomal activity and integrity may be affected by these modified lipoproteins. Therefore we evaluated lysosomal membrane stability in MG-63 cells exposed to OxLDL by acridine orange (AO) staining. Confocal scanning microscopy presented in figure 3.5 demonstrated that there are less red fluorescence spots when cells are exposed to OxLDL indicating lysosomal membrane damage. This reduced red staining was accompanied with increased green cytosolic fluorescence, reflecting a lower cytosolic

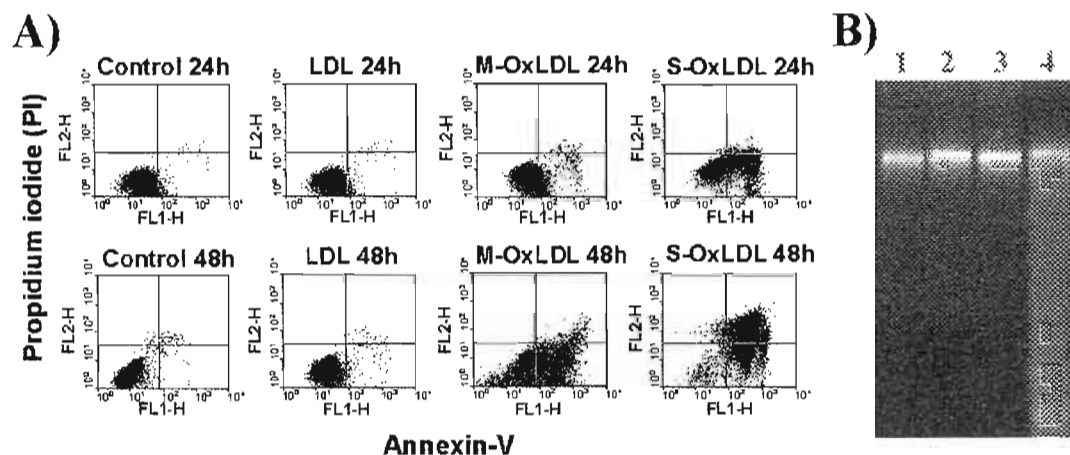


Figure 3.4 : OxLDL induced apoptosis of MG-63 cells. *Annexin-V labeling (A) :* MG-63 cells seeded in 6-well plates were incubated in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS without or with 200 μ g of protein/ml of native LDL, M-OxLDL and S-OxLDL during 24 and 48 h. The cells were then labeled with Annexin-V-FITC and propidium iodide and examined with a FACScan (Becton Dickinson). *DNA fragmentation (B) :* MG-63 cells were incubated, or not (lane 1), with 200 μ g of protein/ml of native LDL (lane 2), M-OxLDL (lane 3) and S-OxLDL (lane 4) during 72 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. DNA was then extracted as described in Experimental procedures and migrated on 2% agarose gel.

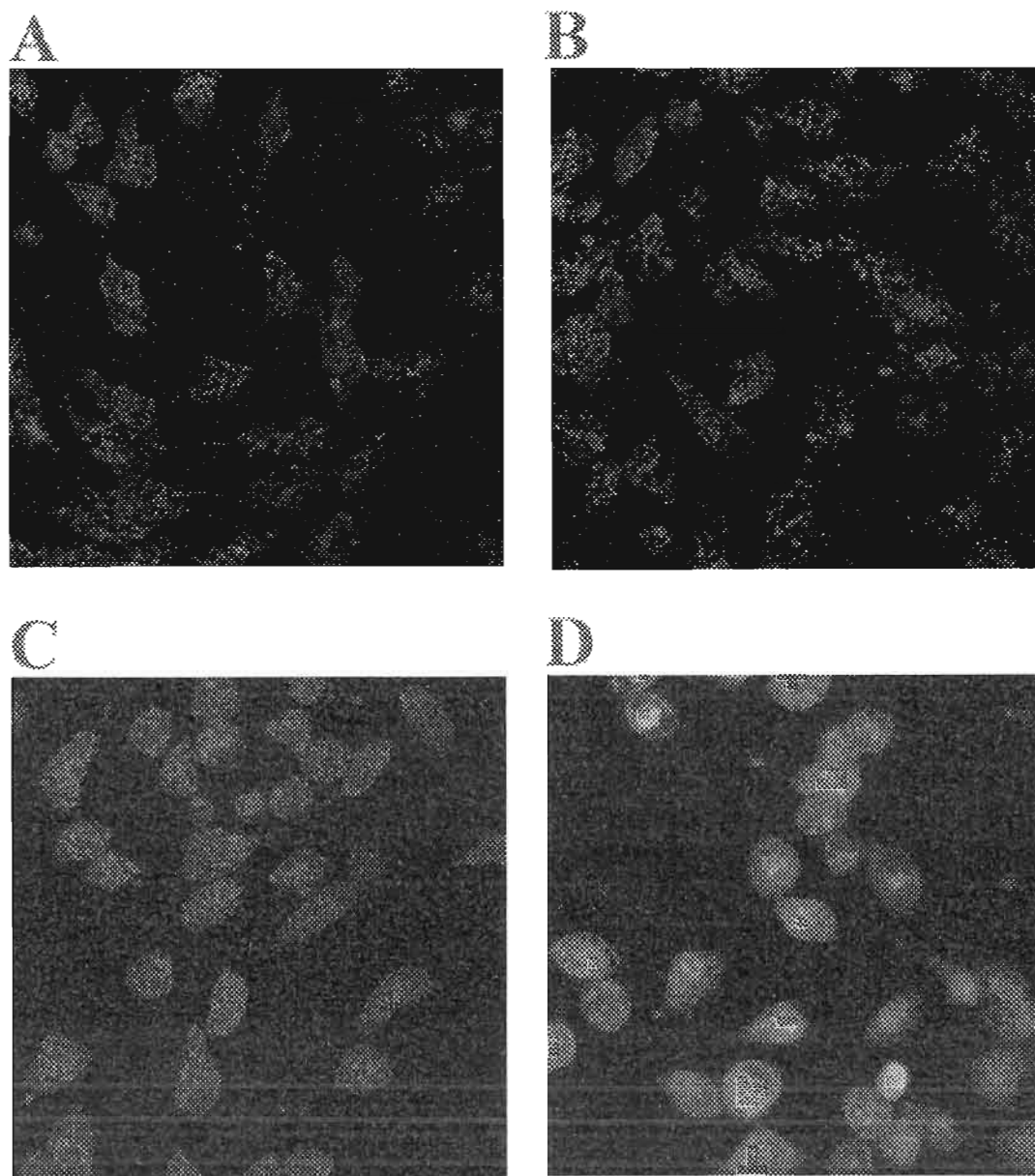


Figure 3.5 : Impact of OxLDL on lysosomal membrane integrity. MG-63 cells seeded in LabTek chambers were incubated in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS without (A) or with 200 µg of protein/ml of native LDL (B) M-OxLDL (C) and S-OxLDL (D) during 24 h. The cells were then labeled with acridine orange as described in Experimental procedures and examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) with a Plan-Apochromatic 60X oil N.A. 1.4 objective lens.

pH due to the protons redistribution and thus the trapping of protonized HAO⁺ in the cytosol of damaged cells. This phenomenon was very apparent for cells exposed to S-OxLDL (Figure 3.5D) and marginally for those incubated with M-OxLDL (Figure 3.5C) but not in cells that had been incubated without lipoproteins (Figure 3.5A) or with native LDL (Figure 3.5B).

The AO re-localization suggested that lysosomal membrane damage was responsible of the effects of OxLDL on the viability of osteoblastic cells. To verify this possibility we incubated MG-63 cells with OxLDL in presence or absence of chloroquine (50 μ M) to inhibit lysosomal activity. At this concentration, chloroquine does not affect the viability of MG-63 cells (data not shown). The results presented in figure 3.6A indicate that in presence of chloroquine, M-OxLDL dose-dependently reduce MTT activity of osteoblasts (ANOVA, $P < 0.0001$). This effect was accentuated with time of exposure (Figure 3.6B). Similarly, the addition of S-OxLDL in the presence of chloroquine prevented the rise of cellular MTT activity induced by OxLDL and rather accentuated the loss of MTT activity in MG-63 cells (ANOVA, $P < 0.0001$) (Figure 3.6C and 3.6D).

3.6. Oxidation of LDL by MG-63 cells :

Given that various types of cells within the vascular wall have been previously shown to oxidize LDL (Beckman *et al.* 1990 ; Graham *et al.* 1989) and thereby potentially increasing the local concentrations of OxLDL, we evaluated the capacity of osteoblastic cells to oxidize LDL. MG-63 cells were incubated with native LDL (250 μ g/ml) in DMEM-F12 medium for 24 h. Afterwards, the oxidative status of LDL was evaluated on agarose-barbital gel and by measuring TBARS levels in the incubation medium. As shown in figure 3.7A, LDL incubated with MG-63 cells migrated faster on agarose-barbital gels compared to LDL incubated without cells. Importantly, incubation of LDL with HepG2 cells (hepatoma cell line) did not induce a modification in the mobility of the LDL particles (Figure 3.7A), indicating that

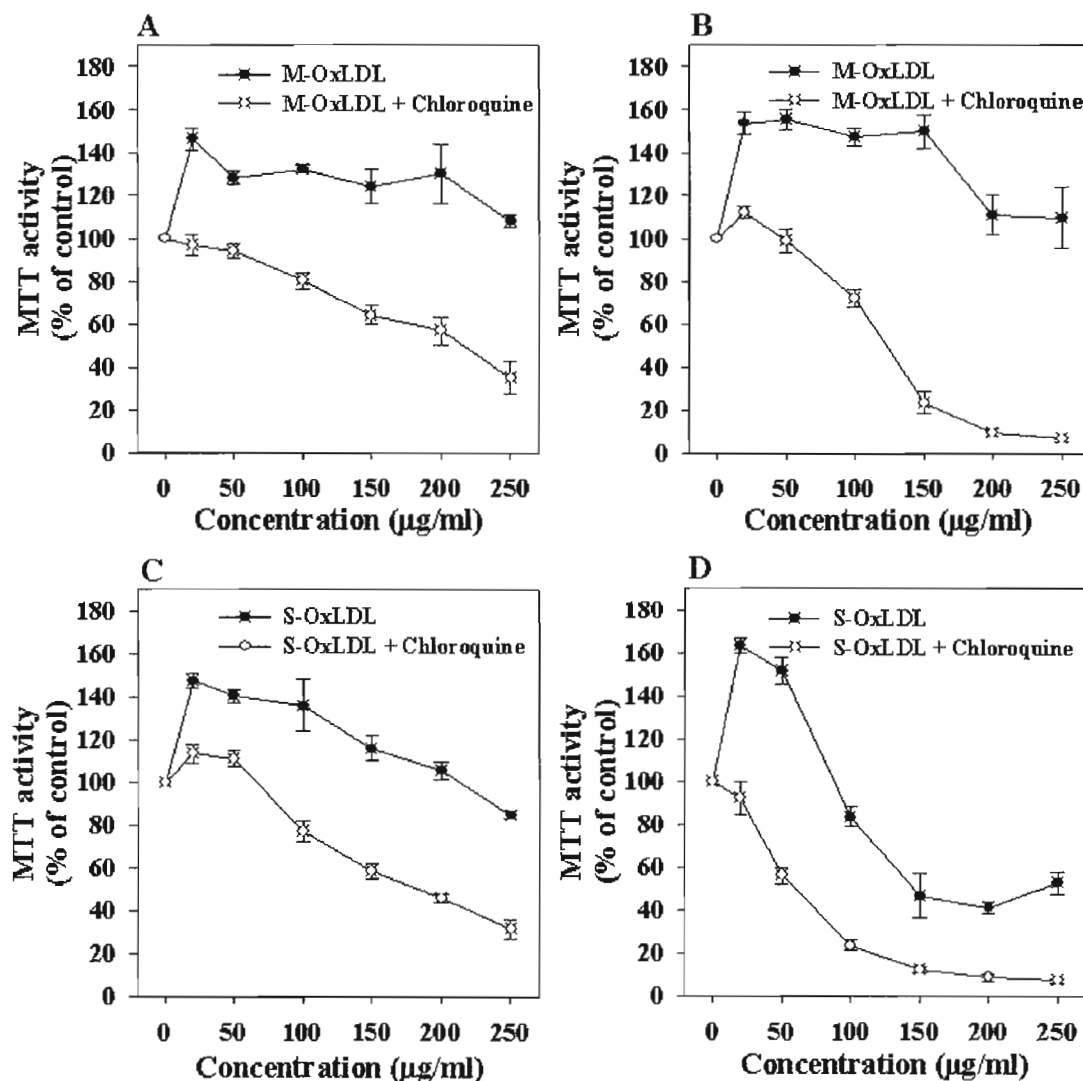


Figure 3.6: Effect of oxidized LDL on osteoblastic MTT activity in the presence of chloroquine. MG-63 cells were incubated with increasing concentration (20-250 µg of protein/ml) of M-OxLDL (A and B) and S-OxLDL (C and D) during 24 (A and C) and 48 h (B and D) in DMEM-F12 containing 2% LPDS and supplemented or not with 50 µM of chloroquine. MTT activity is expressed as the mean \pm S.E.M. of 5 experiments conducted each in triplicate. Statistical differences were determined with a 2 way ANOVA.

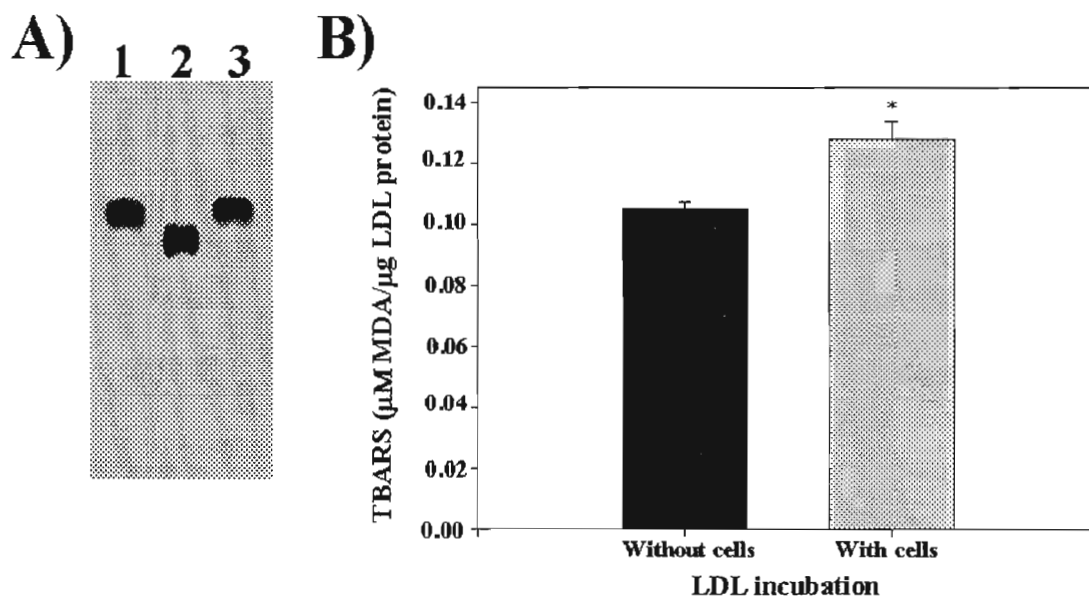


Figure 3.7 : LDL oxidation induced by MG-63 cells: Human native LDL (250 $\mu\text{g/ml}$) were incubated for 24 h in DMEM-F12 medium in the presence or absence of osteoblastic cells. *A)* LDL incubated in the absence (lane 1) or presence of MG-63 cells (lane 2) or HepG2 cells (lane 3) were subjected to electrophoresis on 0.5% agarose-barbital gel. This result is representative of 3-5 different experiments. *B)* The level of oxidized lipids in the medium was evaluated by measuring thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels and expressed as the mean \pm S.E.M of μM malondialdehyde (MDA) per μg of LDL protein of 4 experiments. Statistical differences were determined with a *t*-test. * Statistically different ($P < 0.05$) from the result obtained with LDL incubated without cells.

LDL oxidation is a process specific to some cell lines that is not accomplished by all metabolic active cells. Moreover, as shown in figure 3.7B, TBARS levels in the medium were increased by 20% when LDL were incubated in the presence of MG-63 cells. Therefore, these results indicate that LDL incubated with MG-63 cells are oxidized by these cells.

4.DISCUSSION

A number of epidemiologic studies have demonstrated the existence of a correlation between the development of atherosclerosis and osteoporosis (Barengolts *et al.* 1998 ; Shiraki *et al.* 1997 ; Uyama *et al.* 1997). However, the mechanisms and factors responsible for the parallel apparition of these two pathologies remain relatively unknown. Since it is widely recognized that OxLDL are actively implicated in cardiovascular diseases, they may be also implicated in the development of osteoporosis. We thus hypothesized that OxLDL may also be involved in the alteration of osteoblast functions by affecting their viability. Therefore, here we evaluated if OxLDL are metabolized by osteoblasts and if this metabolism could modulate the viability of osteoblastic cells.

To further document the metabolism of OxLDL by bone cells, OxLDL protein and lipid association assays were conducted. Data show that a portion of OxLDL can selectively transfer their CE to osteoblasts as demonstrated by the higher lipid than protein association, while another fraction is degraded (Figure 3.1C and 3.1D). It is known that many scavenger receptors can interact with OxLDL and members of the scavenger receptor of class B family (SR-BI/II and CD36) were shown to be expressed by osteoblastic cells (Brodeur *et al.* 2008). Interestingly, in other cell types they were shown to be involved in OxLDL metabolism. In vivo studies have revealed that SR-BI of non-parenchymal liver cells are responsible for S-OxLDL CE-selective uptake (Bourret *et al.* 2006). Differently, it was demonstrated that OxLDL

were processed by holoparticle uptake in SR-BI-transfected CHO cells (Gillotte-Taylor *et al.* 2001). Therefore, SR-BI could perform OxLDL-CE selective uptake or endocytosis. The importance of CD36 in the OxLDL uptake was also demonstrated by studies showing that macrophages internalize preferentially OxLDL by CD36 (Nozaki *et al.* 1995 ; Podrez *et al.* 2000). Further investigation is therefore needed to determine the receptor(s) responsible for the selective or endocytic uptake of OxLDL by osteoblasts.

The influence of OxLDL on the cells of the vascular wall is variable. Indeed, parallel studies have shown OxLDL to be able to induce both cell death and cell proliferation depending of cell types and OxLDL concentrations used (Chisolm *et al.* 2000 ; Salvayre *et al.* 2002). In order to determine whether OxLDL causes similar effects on osteoblast viability, MTT assays were conducted on MG-63 cells exposed to different concentrations of OxLDL over various periods of time. Figure 3.2 show that native LDL have no effect on osteoblast viability. This result is in contradiction with previous report which showed osteoblast cell death induced by LDL (Klein *et al.* 2003). These conflicting results may be explained by the use of different types of osteoblasts, given that Klein *et al.* (2003) used more differentiated osteoblastic SaOS human cells. Therefore, it remains possible that LDL may affect differently the viability of osteoblasts in view of their levels of differentiation. In contrast to native LDL, OxLDL have a pronounced effect on the MTT activity of MG-63 cells, since a mild oxidation of LDL increased this activity by approximatively 50% at all concentrations used (Figure 3.2B). Similar results were obtained when MG-63 cells were exposed to low concentrations of S-OxLDL. This higher MTT activity mediated by OxLDL point on a proliferative effect of these modified lipoproteins, which was confirmed by ^3H -thymidine incorporation and cell count (Figure 3.3).

On one hand, this cell proliferation effect of OxLDL is not in agreement with the hypothesis ~~that~~ OxLDL is implicated in osteoporosis development, given that a

higher rate of osteoblast proliferation would be associated with higher bone formation. However, it can be speculated that this proliferative effect is also accompanied by detrimental effects of OxLDL on osteoblast functions. In accordance, it is well known that induction of genes associated with matrix maturation and mineralization is associated with a reduced mitogenic activity of osteoblastic cells (Owen *et al.* 1990 ; Stein *et al.* 1990). Therefore, by increasing osteoblastic proliferation, OxLDL probably also reduce osteoblast functions as mineralization and thus potentially lead to osteoporosis. This is also supported by the demonstration that minimally OxLDL reduced the differentiation of murine marrow stromal cells (Mody *et al.* 2001). On the other hand, the reduction of MTT activity in cells treated with high concentrations of S-OxLDL suggests osteoblastic cell death and would be in accordance with a defect in bone formation. Thus our results show that osteoblastic cell viability is dependent on the oxidative status of LDL and their concentrations, since low concentrations of OxLDL induce mitogenic effect (Figure 3.3) and high concentrations induced apoptosis (Figure 3.4).

Several studies with murine macrophages have reported accumulation of free cholesterol in lysosomes after incubation of cells with OxLDL (Maor *et al.* 1994 ; Maor *et al.* 1995). Other studies have also shown that OxLDL are resistant to lysosomal enzymes and OxLDL may also inactivate lysosomal acid hydrolases (Hoppe *et al.* 1994 ; Jessup *et al.* 1992 ; Loughheed *et al.* 1991). These observations are in accordance with the present demonstration that OxLDL are poorly degraded by osteoblasts (Figure 3.1D), suggesting their accumulation in lysosomes. To further characterize the impact of OxLDL on MG-63 lysosomal activity and integrity, we stained osteoblasts with AO. The results demonstrated that OxLDL decreased the AO accumulation within lysosomes in favour of its cytosolic distribution (Figure 3.5), indicating that OxLDL increased lysosomal pH and induced lysosomal membrane damage. This effect on lysosomal membrane stability was previously associated with the leakage in the cytosol of lysosomal enzymes causing cell death

(Boya *et al.* 2003 ; Li *et al.* 1998). In order, to further confirm that defect in lysosomal activity was responsible of cell death induced by OxLDL, we used chloroquine to inhibit or further inhibit lysosomal activity. Results showed that chloroquine inhibited the proliferative effect of OxLDL in favour of the cytotoxic effects of OxLDL (Figure 3.6). Therefore, it can be speculated that in presence of chloroquine, lysosomal membrane permeabilization and re-localisation of lysosomal enzymes to the cytosol were accentuated. However, further investigations are essential to determine the implication of the lysosomal activity in the osteoblastics death induced by OxLDL.

Given that it is suggested that OxLDL are generated locally in the vascular wall during the development of atherosclerosis (Ehara *et al.* 2001), we examined the possibility that osteoblastic cells may also be able to directly oxidize LDL and consequently to increase the local concentration of these modified particles. Results clearly show that LDL exposed to osteoblastic cells have been oxidized, since LDL incubated with MG-63 cells migrate faster on agarose-barbital gel than those incubated without cells (Figure 3.7A). This result is further supported by the demonstration that TBARS levels are 20% higher for LDL incubated with MG-63 cells (Figure 3.7B). Given this clear demonstration of LDL oxidation by MG-63 cells, it is surprising to observe that LDL have no effect on the viability of these cells. However, it can be speculated that the level of oxidation generated in this condition is not sufficiently elevated to induce mitogenic or apoptosis effects. Moreover, as LDL are efficiently taken up and degraded by MG-63 cells, the LDL concentration in the medium is gradually reduced and probably not enough to induce deleterious effects.

In summary this study demonstrated that OxLDL are taken up by osteoblasts via a selective lipid uptake mechanism and also globally by endocytosis. Our results also demonstrate that after this holoparticle uptake, OxLDL are trapped in the osteoblasts given the weak degradation process of OxLDL. This inability of osteoblasts to

degrade OxLDL is likely responsible of the lysosomal membrane damage induced by OxLDL. This inhibition of the lysosomal activity by OxLDL would be responsible of the osteoblasts death given that inhibition of lysosomal degradation with chloroquine accentuated this effect. Finally, we also showed that low concentrations of OxLDL favour proliferation of osteoblasts and that those osteoblastic cells oxidize native LDL. Taken together, these results indicate that OxLDL affect the viability of osteoblasts and are therefore a potential candidate for osteoporosis development under atherogenic conditions.

5.ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Mr. Denis Flipo for his expert assistance with confocal microscopy and acknowledge Ms. Marie-Claude St-Louis for helpful scientific discussion. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research.

CHAPITRE IV

HDL₃ reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death.

Mathieu R. Brodeur¹, Louise Brissette², Louise Falstrault²,
and Robert Moreau^{1*}

¹Laboratoire du métabolisme osseux, ²Laboratoire du métabolisme des lipoprotéines,

Ce chapitre présenté sous forme d'article scientifique, qui fut récemment accepté pour publication dans la revue *Journal of Cellular Biochemistry*, est également le résultat d'un travail d'équipe. Ainsi, les cultures cellulaires, l'oxydation des LDL, les essais de compétition et d'association protéique et lipidique, les essais MTT, les expériences d'externalisation de la phosphatidylsérine, les essais d'efflux de cholestérol, les immunobuvardages et les marquages à l'acridine orange ont été réalisés par l'auteur de cette thèse (M. Brodeur). Le marquage des lipoprotéines a été effectué par Louise Falstrault. J'ai écrit le manuscrit et réalisé les figures et fait les corrections en fonction des commentaires judicieux de Louise Brissette et Robert Moreau. Ces deux derniers ont également contribué en assurant le support financier et intellectuel essentiels à la réalisation d'un tel travail.

ABSTRACT

Oxidized low density lipoproteins (OxLDL) are known to promote atherosclerosis, but it is only recently that OxLDL have been associated with alterations of the functions of bone-forming osteoblasts and osteoporosis. Although high density lipoproteins (HDL) are recognized for their anti-atherogenic action, there is less information about their ability to protect against osteoporosis. Therefore, we investigated the capacity of HDL₃ to prevent the cell death induced by OxLDL in human osteoblastic MG-63 cells. Simultaneous exposure of the cells to HDL₃ and OxLDL abolished the reduction of cell viability monitored by MTT activity measurement and the induction of apoptosis determined by annexin V staining indicating that HDL₃ prevent the apoptosis of osteoblasts induced by OxLDL. This protection correlated with the displacement by HDL₃ of OxLDL association to osteoblasts, signifying that OxLDL binding and/or internalization are/is necessary for their cytotoxic effects. We also found that exposition of osteoblastic cells to HDL₃ prior to incubation with OxLDL reduced cell death and preserved the lysosomal integrity. This protection was correlated with an increase of SR-BI expression, a modification of OxLDL metabolism with less global uptake of OxLDL and greater selective uptake of cholesterol from OxLDL. These results strongly suggest that, as for atherosclerosis, HDL may exert beneficial actions on bone metabolism.

1.INTRODUCTION

The bone is a living tissue that is continuously being remodeled. This process implies, first, the breaking down of the bone by the action of the osteoclasts (Rodan *et al.* 2000). In a second step, differentiated osteoblastic cells are recruited to the resorption lacunae where they secrete a variety of proteins such as type I collagen and noncollagenous proteins to generate a new bone matrix (Rodan *et al.* 2000). Aside from their role in the reconstruction of bone matrix, osteoblasts are also involved in

the regulation of osteoclastic differentiation and bone resorption, given their capacity to secrete a variety of factors necessary for osteoclastogenesis regulation such as macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (Kodama *et al.* 1991) and osteoprotegerin (OPG) (Akatsu *et al.* 1998 ; Udagawa *et al.* 2000). Therefore, adequate osteoblastic proliferation/apoptosis, differentiation and secretory functions are essential not only for bone formation but also for the regulation of bone resorption process.

The loss of equilibrium between osteoblastic and osteoclastic functions, in favor of increased osteoclast-mediated bone resorption over bone formation by osteoblasts, results in osteoporosis that is characterized by reduced bone mass, lower mineral density, and thereby higher bone fragility and susceptibility to fractures. Although the exact etiology of osteoporosis remains to be clarified, in numerous cases growing evidence suggests that atherogenic conditions are positively associated with osteoporosis development. Individuals with lower bone density and osteoporosis also present higher lipid levels (Barengolts *et al.* 1998 ; Laroche *et al.* 1994 ; Uyama *et al.* 1997), a condition considered as an important atherogenic risk factor (Castelli *et al.* 1997). Other pieces of evidence suggesting a possible role of blood cholesterol in bone metabolism regulation include the observation of reduced bone formation in atherosclerosis-susceptible C57BL/6 mice maintained under an atherogenic high-fat diet (Parhami *et al.* 2001).

Although, these studies suggest the existence of one or several contributory factors for the parallel development of atherosclerosis and osteoporosis, it is only recently that OxLDL were identified as one of these possible factors. OxLDL have been shown to affect the differentiation of cells towards an osteoblastic phenotype. Indeed, calcifying vascular cells (CVC), isolated and cloned from a subpopulation of aortic medial smooth muscle cells, undergo osteoblastic differentiation after an exposition to OxLDL or acetylated LDL (Parhami *et al.* 1997). In contrast, OxLDL

and oxidative stress inhibit osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and preosteoblasts (Parhami *et al.* 1997 ; Mody *et al.* 2001). Moreover, Tintut *et al.* (2004) have reported increased levels of lipid hydroperoxides in bone marrow of hyperlipidemic mice. The potential implication of OxLDL in the development of osteoporosis is further supported by the demonstration that OxLDL caused cell death in human osteoblasts (Hirasawa *et al.* 2007 ; Klein *et al.* 2003). Furthermore we have reported that OxLDL are poorly degraded by osteoblasts, that they accumulate in the lysosomal compartment, induce the loss of the lysosomal integrity and elicit that causes cell death. This was supported by the demonstration that chloroquine, an inhibitor of lysosomal activity, accentuated cell death induced by OxLDL (Brodeur *et al.* 2008) .

It is well established that cardiovascular diseases are directly related to plasma concentrations of LDL-cholesterol (Castelli *et al.* 1997) and inversely associated with high density lipoproteins (HDL)-cholesterol (Gordon *et al.* 1998). However, the potential of HDL to protect against osteoporosis is somewhat controversial. Indeed, a positive correlation has been found between HDL and bone mineral density (Dennison *et al.* 2007 ; Solomon *et al.* 2005 ; Yamaguchi *et al.* 2002) and a negative correlation was reported with bone remodeling markers (Majima *et al.* 2008), as well as with the risk of fractures (Martínez-Ramírez *et al.* 2007), while two studies found no relationship (Cui *et al.* 2005 ; Poli *et al.* 2003) and one group reported an inverse relationship (D'Amelio *et al.* 2001). Although the mechanisms of protection afforded by HDL on cardiovascular diseases are not clearly identified, it was attributed to various characteristics of these lipoprotein particles. Classically, the atheroprotective mechanism of HDL is thought to be related to its role in reverse transport of cholesterol from peripheral tissues to liver (Kwiterovich *et al.* 1998). HDL₃ have been shown to inhibit apoptosis induced by OxLDL in the monocytic RAW264.7 cells by promoting cholesterol efflux (Jiang *et al.* 2006). Another important characteristic of HDL is their capacity to prevent the oxidative modification of LDL

since it was demonstrated that lipophilic antioxidants carried by HDL can interrupt LDL oxidation cascade (Navab *et al.* 2004), thereby preventing the formation of proatherogenic OxLDL. In addition, HDL can deliver antioxidants such as vitamin E to cells (Mardones and Rigotti, 2004), and vitamin E has been shown to protect from OxLDL-induced cell death in endothelial cells (Vieira *et al.* 1998) and coronary smooth muscle cells (de Nigris *et al.* 2000). Furthermore, several studies have demonstrated that HDL inhibit cell signaling mediated by OxLDL and thus offset several adverse biological effects (Lee *et al.* 2005 ; Robbesyn *et al.* 2003 ; Schmidt *et al.* 2006 ; Suc *et al.* 1997). At the level of endothelium, it was demonstrated that the protective effect of HDL depends on stimulation of nitric oxide (NO) formation which regulates vasoreactivity (Rämet *et al.* 2003). This induction of NO production comes from the activation of phosphoinositol-3 kinase which induces the AKT pathways (Ozaki *et al.* 2003). The activation of this survival pathway by HDL leads also to the inhibition of the apoptosis of endothelial cells by inhibiting the mitochondrial apoptosis pathway (Nofer *et al.* 2001 ; von Eckardstein *et al.* 2005). Moreover, Klein *et al.* (Klein *et al.* 2006) have also demonstrated that native LDL induce SaOS cell death by the inhibition of AKT, suggesting that by their ability to activate this pathway, HDL could counteract this effect.

Our aim was to investigate if and how HDL₃ have the ability to counteract the osteoblastic death induced by OxLDL. Despite the fact that the protective effects of HDL have been related to numerous properties, the impact of HDL on the cellular metabolism of OxLDL has not been investigated. This issue is particularly important given the demonstration that OxLDL accumulation in cells leads to detrimental effects (Li *et al.* 1998). In accordance, we have reported that OxLDL accumulation in osteoblast lysosomes leads to apoptosis, which further indicates that OxLDL internalization is a process particularly important in osteoblasts exposed to OxLDL (Brodeur *et al.* 2008). Recently, we have demonstrated that osteoblastic cells express the scavenger receptor class B type I (SR-BI) and the cluster of differentiation-36

(CD36) (Brodeur *et al.* 2008). Both receptors bind OxLDL and HDL, suggesting therefore that HDL could inhibit the apoptosis induced by OxLDL by inhibiting their internalization and thereby, their metabolism. Here, using human osteoblastic MG-63 cells, we report that OxLDL binding and/or internalization are/is necessary for OxLDL cytotoxic effects. We also show that exposition of osteoblastic cells to HDL₃ prior to incubation with OxLDL reduces cell death and preserves lysosomal integrity. Moreover we demonstrate that this protection is correlated with an increase of SR-BI expression and a modification of OxLDL metabolism as illustrated by less OxLDL global uptake but greater cholesteryl ester selective uptake from OxLDL.

2.EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. Materials :

The human osteoblast-like cell line MG-63 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 without phenol was bought from Sigma (St Louis, MO, USA). Glutamine, Trypsin-EDTA and penicillin–streptomycin solutions were purchased from Invitrogen Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Foetal bovine serum (FBS) was purchased from Cansera (Etobicoke, Ontario, Canada). ¹²⁵Iodine (as sodium iodide, 100 mCi/mmol) was bought from ICN Canada (Montreal, Quebec, Canada), while [1,2-³H(N)]-cholesterol (40-60 Ci/mmol) came from Perkin Elmer Life Sciences (Woodbridge, Ontario, Canada). 1,2-[³H]-cholesteryl oleate (50 mCi/mmol) was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Laval, Quebec, Canada). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide (MTT), fatty acid-free (FFA) and regular bovine serum albumin (BSA) (fraction V), acridine orange, and β-cyclodextrin were purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada).

2.2. Osteoblast cell culture :

MG-63 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 without phenol (DMEM-F12). The media was supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Cells were cultured in 5% CO₂ at 37 °C and were harvested once a week with Trypsin-EDTA. For experiments, cells were trypsinized, seeded at 2000 cells/cm² and cultured for 5 days prior to the assays.

2.3. Isolation and radio labeling of lipoproteins :

Lipoproteins were isolated from human plasma obtained from Bioreclamation (Hicksville, NY, USA). Before the isolation, the plasma was adjusted to 0.01% ethylenediamine tetraacetate (EDTA), 0.02% sodium azide and 10 µM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF). Human LDL (d = 1.025-1.063 g/ml), and HDL₃ (density 1.125-1.21 g/ml) were prepared by ultracentrifugation as described by Brisette *et al.* (1996). Lipoproteins were iodinated by a modification (Langer *et al.* 1972) of the iodine monochloride method of McFarlane (1948). Briefly, 1 mCi of sodium ¹²⁵iodide was used to iodinate 2.5 mg of lipoprotein in the presence of 30 nmoles of iodine monochloride in 0.5 M glycine-NaOH, pH 10. Free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by dialysis in Tris-buffered saline (TBS). The specific radioactivity ranged from 100,000 to 250,000 cpm/µg protein.

2.4. Lipoprotein modification :

LDL preparations were dialyzed against TBS to remove EDTA before oxidation. Standardly OxLDL (S-OxLDL) were prepared as described by Loughheed and Steinbrecher (1996). LDL (200 µg of protein/ml in TBS) was incubated with 5 µM CuSO₄ for 20h at 37°C. Oxidation was stopped by the addition of EDTA (final concentration of 100 µM) and butylated hydroxytoluene (40 µM final) and the OxLDL were concentrated to 15-20 mg/ml using Centriplus-100 ultrafiltration devices

(Amicon, Oakville, Ont.). S-OxLDL typically resulted in a 2.8-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL on 0.5 % agarose/barbital gels. Mildly OxLDL (M-OxLDL) were obtained after 4 h of incubation under similar conditions and showed a 1.5-fold increase in the electrophoretic mobility relative to native LDL.

2.5. Competition assays :

Unlabeled HDL₃, LDL and S- or M-OxLDL were used as competitors for ¹²⁵I-OxLDL association with cells. Cells were washed twice with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 2 h at 37°C with 20 µg of protein/ml of ¹²⁵I-OxLDL in a total volume of 250 µl containing 125 µl of culture medium (2X), 4% BSA, pH 7.4 (total binding). ¹²⁵I-OxLDL were incubated with cells in the presence of increasing concentrations of unlabeled competitors (0-800 µg/ml). At the end of the incubation, the cells were washed once with 1 ml of PBS containing 0.2% BSA (PBS-BSA) followed by one wash with 1 ml of PBS. The cells were then solubilized in 1.5 ml of 0.2 N NaOH. Radioactivity counts in the homogenates were obtained with a Cobra II counter (Canberra-Packard). The 100% specific association value was calculated by subtracting the non-specific association data (obtained by the addition of 2 mg of protein/ml of the proper unlabeled OxLDL) from the total association.

2.6. MTT activity assays :

MTT activity was determined in 96-well plates (Sarstedt) by microtiter tetrazolium assay after incubation of cells with lipoproteins during 24, 48 h in DMEM-F12 supplemented with 2% of human serum deficient in lipoproteins (LPDS). Briefly, MTT reagent was added to the media at a final concentration of 0.5 mg/ml. Four hours later, formazan crystals generated by cellular reduction of the MTT reagent were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) for 30 min at 37°C and the absorbance was determined at 575nm. Results are expressed as the percentage of MTT values of treated versus control conditions.

2.7. Cholesterol efflux assay :

Cells at 80% confluence were labeled with 1 μCi [1,2- $^3\text{H}(\text{N})$]-cholesterol for 24 hours at 37°C and then equilibrated with 1 ml of DMEM-F12-0.2% BSA for 24 hours at 37°C . Efflux assay was performed in the absence or presence of 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HDL₃ for 4 hours at 37°C . At the end of the incubation, the medium was harvested and the cells were solubilized in 1.5 ml of 0.1 N NaOH, assayed for protein content and counted for radioactivity in beta-counter (Wallach-Fisher). Percentage of efflux was calculated by subtracting the radioactive counts in the absence of HDL₃ from the radioactive counts in the presence of HDL₃ and then divided by the sum of the radioactive counts in the media plus the cell fraction.

2.8. Cellular lipoprotein association assays :

Cellular association assays of ^{125}I -lipoprotein or ^3H -CE-lipoprotein (20 μg of protein/ml) were conducted essentially as for competition studies with the use of a beta-counter (Wallack-Fisher) if cells were incubated with [^3H]CE-lipoproteins. The results are expressed in μg of lipoprotein protein/mg of cell protein. To compare the association of lipoproteins labeled in protein (^{125}I) or in CE (^3H), the association data of ^3H -CE-lipoprotein were also estimated as μg of lipoprotein protein/ μg of lipoprotein protein (apparent uptake). To achieve this, the specific activity of ^3H -CE-lipoprotein was expressed in counts per minute per μg of lipoprotein protein. The specific association was calculated by subtracting the non-specific association from the total association. Selective uptake of CE is observed when specific [^3H]CE-lipoproteins association minus specific ^{125}I -lipoprotein association is greater than zero.

2.9. Evaluation of lysosomal integrity by acridine orange staining :

MG-63 cells incubated in presence or absence of HDL₃ (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h were exposed or not to OxLDL (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and were vitally stained with an acridine orange (AO) solution at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of complete medium for 30 min at 37°C . The

intensities of red and green AO fluorescence were then examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) with a Plan-Apochromatic 60X oil N.A. 1.4 objective lens.

2.10.Immunoblotting :

Total proteins of MG-63 cells were extracted by ice cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% IGEPAL and 60 mM Octylglucoside) containing 1 mM Na_2VO_3 , 0.1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 0.5 mM Benzamidin and 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin. Proteins were separated on 8% reducing SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Immunodetections were performed with anti-SR-BI and CD36 polyclonal antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO) or anti-Actin monoclonal antibody (Sigma) followed by enhanced chemiluminescence detection on Kodak Biomax ML film.

2.11.Other methods :

Protein content was determined by the method of Lowry (1951) with BSA as standard. Student's t or ANOVA test was used to obtain statistical comparison of the data. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3.RESULTS

3.1. HDL offset cell death induced by OxLDL :

We previously demonstrated that high concentrations of OxLDL induced osteoblastic cell death (Brodeur *et al.* 2001). To evaluate the potential of HDL₃ to inhibit apoptosis, we exposed MG-63 cells to 200 $\mu\text{g/ml}$ of OxLDL in the absence or presence of increasing concentrations of HDL₃ (20-200 $\mu\text{g/ml}$). Thereafter, osteoblastic cell viability was evaluated by MTT assays. The results presented in figure 4.1 show that after 24 h of incubation in the absence of HDL₃, M-OxLDL and S-OxLDL reduced MTT activity by 40% and 50%, respectively. This reduction was

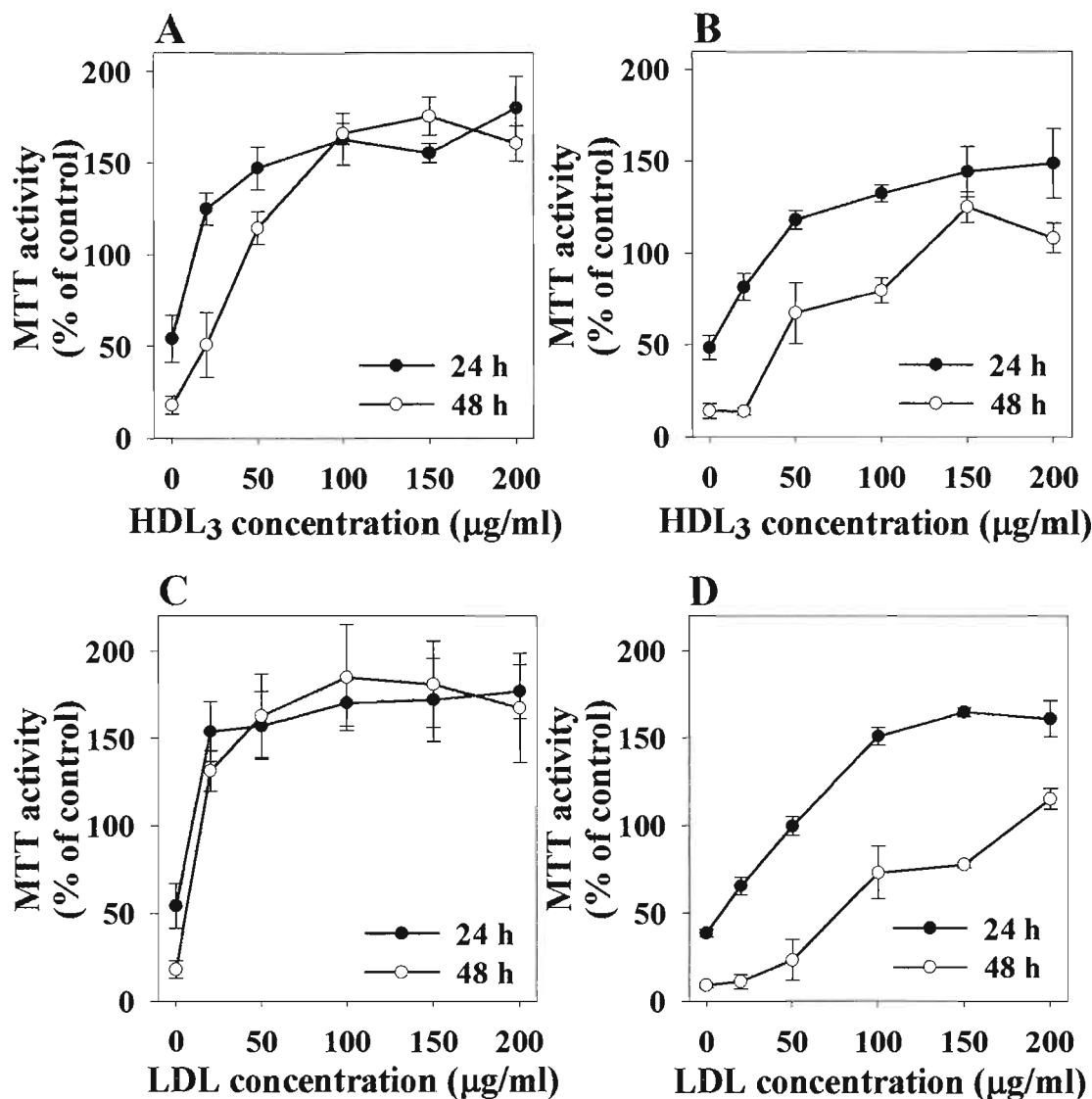


Figure 4.1 : Effect of HDL₃ and LDL on OxLDL-induced osteoblastic cell death. MG-63 cells were incubated with 200 μg/ml of M-OxLDL (A and C) or S-OxLDL (B and D) in the absence or presence of increasing concentrations (20-200 μg of protein/ml) of native HDL₃ (A and B) or LDL (C and D) during 24 and 48 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. Cell viability was determined by MTT assays and is expressed as the mean ± S.E.M. of the relative MTT activity compared to control condition of 5 experiments conducted each in triplicate. Statistical differences were determined by one-way ANOVA.

accentuated to 90% after 48 h (Figure 4.1A and 4.1B), indicating that OxLDL decreased MG-63 cell viability in a time-dependent manner. This reduction of MTT activity induced by M-OxLDL after 24 h was completely abolished in the presence of 20 $\mu\text{g/ml}$ of HDL₃ (Figure 4.1A). Higher concentrations of HDL₃ also offset the reduced MTT activity induced by M-OxLDL in favor of an increased activity (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 20 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 4.1A). This higher activity suggests that in presence of HDL₃, M-OxLDL recover their ability to induce cell proliferation as expected from the demonstration that OxLDL have a mitogenic action on osteoblasts at low concentrations (Brodeur *et al.* 2008). Similarly, HDL₃ also inhibited the decrease of MTT activity induced by S-OxLDL, but a higher concentration of HDL₃ (50 $\mu\text{g/ml}$) was needed to completely rescue the effect of S-OxLDL on MTT activity (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 100 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 4.1B). The protecting effect of HDL₃ on the reduction of MTT activity caused by OxLDL was also apparent after 48 h, however higher concentrations of HDL₃ were required (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 50 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 4.1A and B). Together, these results indicate that HDL₃ protect MG-63 cells from death induced by OxLDL. Furthermore, the addition of LDL protected the cells from M-OxLDL-induced death (Figure 4.1C). This protective effect was already evident at the low concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ of LDL and was maintained during 48 h (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 20 $\mu\text{g/ml}$). Similarly, LDL also prevented the reduction of MTT activity induced by 200 $\mu\text{g/ml}$ of S-OxLDL, but as for HDL₃, higher concentrations of LDL were needed to reduce the effect of S-OxLDL on MTT activity (ANOVA, $P < 0.0001$; Dunnett's $P < 0.001$ from 20 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h and from 100 $\mu\text{g/ml}$ for 48 h) (Figures 4.1D).

To further characterize if the inhibition of HDL₃ on the reduction of MTT activity induced by OxLDL results from the inhibition of apoptosis induced by these modified lipoproteins, MG-63 cells were labeled with annexin-V/FITC and propidium iodide (PI). Figure 4.2 shows that S-OxLDL induced apoptosis of MG-63 cells since after

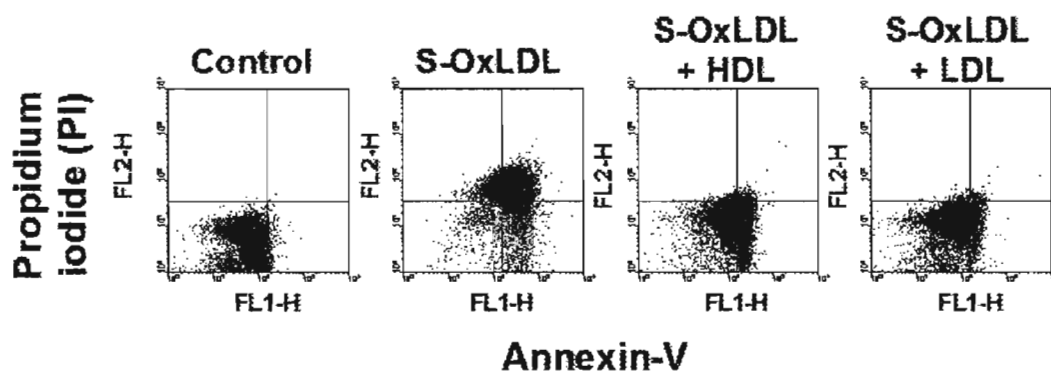


Figure 4.2 : Effect of HDL₃ on OxLDL-induced osteoblastic cell death. MG-63 cells seeded in 6-well plates were incubated during 48 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS without (Control) or with 200 $\mu\text{g/ml}$ of S-OxLDL in the presence or absence of 200 $\mu\text{g/ml}$ of HDL₃. The cells were then labeled with Annexin-V-FITC and propidium iodide. Representative results of three different experiment examined with a FACScan (Becton Dickinson) are shown.

48 h approximately 50% of cells treated with S-OxLDL are annexin-V-positive and gradually move toward the upper right quadrant, typical of a late apoptotic or necrotic stage (Figure 4.2). In accordance with MTT results, externalization of phosphatidylserine (PS) residues induced by S-OxLDL was reduced by the presence of HDL₃ at 200 µg/ml (Figure 4.2), indicating that HDL₃ inhibited the apoptosis induced by OxLDL. As for HDL₃, the results demonstrated that LDL inhibited the apoptosis induced by OxLDL (Figure 4.2). Similar results were also obtained with M-OxLDL (data not shown).

We next incubated cells with increasing concentrations of HDL₃ (0 to 200 µg/ml) alone to evaluate if their protecting action was due to a direct mitogenic action. The results indicated that none of the concentrations of HDL₃ used affects MTT activity or DNA synthesis as demonstrated by ³H-thymidine incorporation assays in MG-63 cells upon 72 h of treatment (data not shown). Therefore, HDL₃ have no direct effect on MG-63 cell viability and proliferation and they offset the apoptotic effects of OxLDL by one or many indirect mechanism(s).

3.2. Competition association assays :

To determine if the protective effect of HDL₃ and LDL resulted from a competition for the association of OxLDL to MG-63 cells, we conducted association assays with ¹²⁵I-M- or ¹²⁵I-S-OxLDL in the presence of competitors. Association of both radioactive ligands was efficiently displaced (>90%) by their corresponding unlabeled counterpart (Figure 4.3). The results also demonstrated that S-OxLDL competed for approximately 70% of M-OxLDL association (Figure 4.3A) and similarly M-OxLDL efficiently reduced ¹²⁵I-S-OxLDL association (approximately 80%) (Figure 4.3B). HDL₃, a well-known ligand of scavenger receptors of class B (SR-BI & CD36), efficiently decreased M- and S-OxLDL association by approximately 60% and 40%, respectively. LDL particles seem also to share a

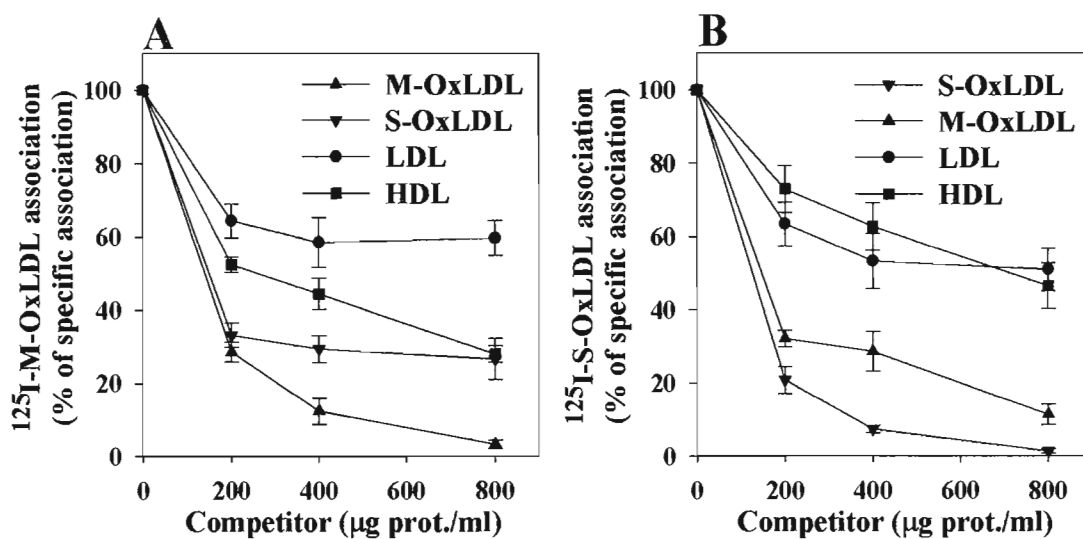


Figure 4.3 : Competition curves of ^{125}I -mildly-OxLDL (A) and ^{125}I -standardly-OxLDL (B) association with MG-63 cells by unlabeled OxLDL, LDL and HDL₃. ^{125}I -lipoproteins at 20 $\mu\text{g/ml}$ were incubated with MG-63 cells during 2 hours at 37°C in 12-well plates in the presence of the indicated concentrations of either unlabeled OxLDL, LDL or HDL₃. The value without competitor in each experiment was set as 100%. Each point represents the mean \pm S.E.M. derived from three to four experiments conducted in duplicate.

common binding site with OxLDL in MG-63 cells, as they decreased OxLDL association by approximately 40% (Figure 4.3). Taken together, these results indicate that HDL₃ and LDL have both the ability to reduce the association of OxLDL with MG-63 cells.

3.3. Evaluation of cholesterol efflux as a protective mechanism against OxLDL-induced cell death :

We next conduct cholesterol efflux experiments to demonstrate that this process is operative in MG-63 cells. The results presented in figure 4.4A show that HDL₃ induced cholesterol efflux from the cells in a dose-dependent manner. In order to define if the protection against cell death brought by HDL₃ is related to cholesterol efflux, we determined the capacity of β -cyclodextrin, a known acceptor of cholesterol (Kilsdonk *et al.* 1995), to promote cholesterol efflux from osteoblastic cells and to prevent cell death induced by OxLDL. We observed that β -cyclodextrin dose-dependently induced cholesterol efflux from MG-63 cells (Figure 4.4A). The results presented in figure 4.4B demonstrates that β -cyclodextrin has no impact on MTT activity of MG-63 cells incubated in presence of native LDL (100 μ g/ml) after 24h of incubation. In contrast, under conditions where OxLDL favor cell proliferation, treatments with M-OxLDL (100 μ g/ml) in the presence of β -cyclodextrin reduce MTT activity of osteoblasts (Figure 4.4B). Similarly, the addition of S-OxLDL in the presence of β -cyclodextrin prevented the rise of cellular MTT activity induced by OxLDL and rather accentuated the loss of MTT activity in MG-63 cells (Figure 4.4B). Similar results were obtained after 48 h (data not shown). Overall, these results suggest that the protective effect of HDL₃ is not a consequence of their cholesterol efflux ability.

As simultaneous incubation of cells with OxLDL and β -cyclodextrin accentuated the loss of MTT activity, we speculated that OxLDL per se may promote cholesterol

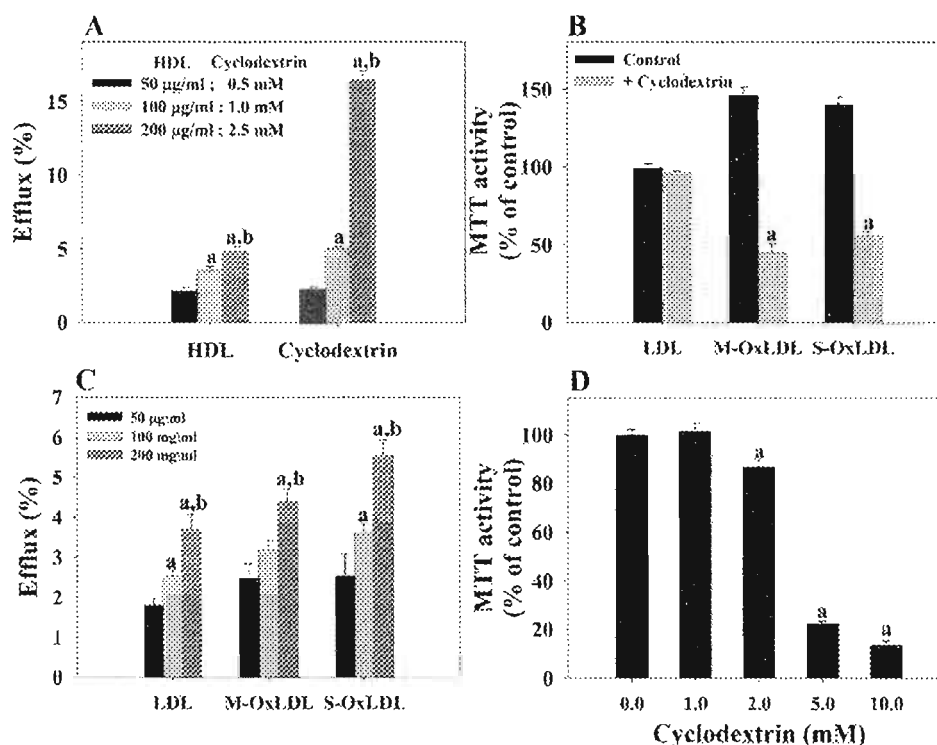


Figure 4.4 : Importance of cholesterol efflux in the protecting effect of HDL₃.

Cholesterol efflux (A) Efflux assays were performed in the absence or presence of 50, 100 and 200 μ g/ml HDL₃ or 0.5, 1.0 and 2.5 mM of β -cyclodextrin during 4 hours at 37°C as described in Experimental procedures. Each result represents the mean percentage \pm SEM of 3-4 experiments each conducted in triplicate. ^aSignificantly different ($p < 0.05$) from the results obtained with 50 μ g/ml or 0.5mM. ^bSignificantly different ($p < 0.005$) from the results obtained with 100 μ g/ml or 1.0 mM. **MTT activity in the presence of β -cyclodextrin (B)** MG-63 cells were incubated with native LDL and OxLDL (200 μ g/ml) during 24 h in DMEM-F12 containing 2% LPDS and supplemented or not with 1 mM of β -cyclodextrin. MTT activity is expressed as the mean \pm S.E.M. of 5 experiments conducted each in triplicate. ^aSignificantly different ($p < 0.05$) from the results obtained with lipoproteins alone. **Cholesterol efflux (C)** Efflux assays were performed in the absence or presence of native LDL and OxLDL as described in Experimental procedures. Each result represents the mean percentage \pm SEM of 3-4 experiments each conducted in triplicate. ^aSignificantly different ($p < 0.05$) from the results obtained with 50 μ g/ml. ^bSignificantly different ($p < 0.05$) from the results obtained with 100 μ g/ml. **Impact of the β -cyclodextrin on cell viability (D)** MG-63 cells were incubated with β -cyclodextrin during 24 h in DMEM-F12 containing 2% LPDS. MTT activity is expressed as the mean \pm S.E.M. of 5 experiments conducted each in triplicate. ^aSignificantly different ($p < 0.05$) from the results obtained without β -cyclodextrin.

cholesterol efflux. In accordance, we found that native LDL and OxLDL also induced cholesterol efflux from MG-63 cells to a similar extent to HDL₃ (Figure 4.4C). Since OxLDL and β -cyclodextrin both induced cholesterol efflux, it became possible that together these efflux mediators decreased cell cholesterol in an additive manner which to a point causes cell death. In accordance, we found that 1 mM of β -cyclodextrin alone promoting a cholesterol efflux of 5% had no effect on MTT activity while concentrations of 2 mM and above associated with higher cholesterol efflux lead to a reduction of the MTT activity (Figure 4.4D).

3.4. Effect of pre-incubation of cells with HDL₃ on OxLDL induced cell death :

In order to determine if HDL could prevent OxLDL-induced cell death via other mechanisms beside the reduction of OxLDL association to MG-63 cells, we next investigated the impact of a HDL₃ pre-treatment on the cell death induced by OxLDL. MG-63 cells were incubated during 24 h with 200 μ g/ml of HDL₃ and thereafter, the media was removed and cells were treated with increasing concentrations of OxLDL (20-200 μ g/ml). Figure 4.5A shows that the decrease of MTT activity induced by M-OxLDL after 24 h was partially counterbalanced by pre-incubation of MG-63 cells with HDL₃, preventing by approximately 30% the reduction of MTT activity caused by 150-250 μ g/ml of M-OxLDL (ANOVA, $P < 0.0001$). This protecting effect also occurred when cells were exposed during 48 h to M-OxLDL (ANOVA, $P < 0.0001$) (Figure 4.5B). However, the results demonstrated that pre-incubation of osteoblasts with HDL₃ does not prevent the reduction of MTT activity induced by S-OxLDL (Figure 4.5C and 4.5D).

3.5. Impact of HDL on the metabolism of OxLDL by osteoblastic cells :

We previously demonstrated that the accumulation of OxLDL in lysosome reduced the MG-63 cell viability by causing lysosomal membrane damage (Brodeur *et al.*

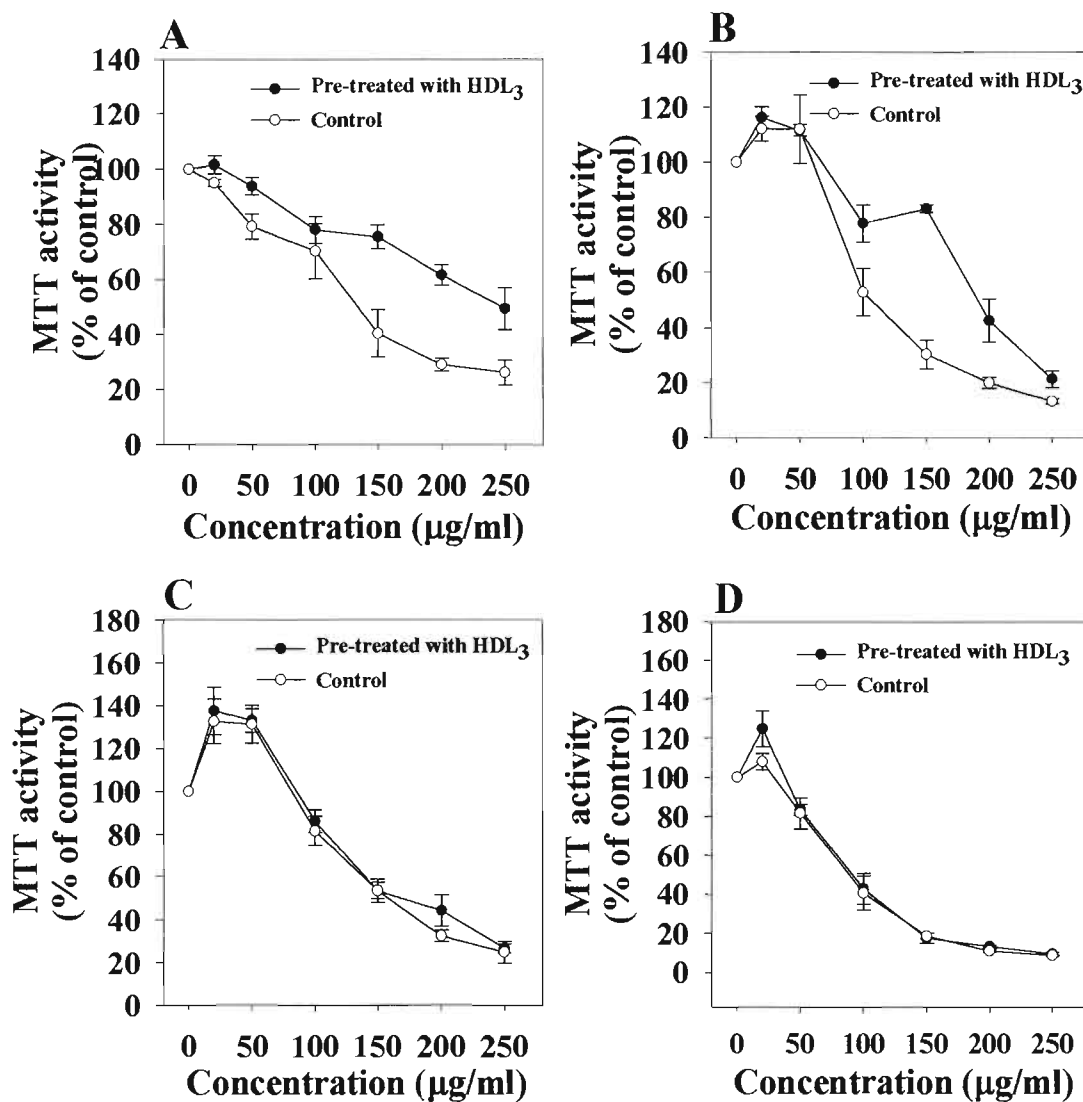


Figure 4.5 : Effect of HDL₃ pre-treatment on OxLDL-induced osteoblastic cell death. MG-63 cells were incubated in absence (open circle) or presence (close circle) of 200 μg/ml of HDL₃ during 24 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS and then incubated with increasing concentrations (20-250 μg of protein/ml) of M-OxLDL (A and B) or S-OxLDL (C and D) during 24 (A and C) and 48 h (B and D) in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. Cell viability was determined by MTT assays and is expressed as the mean ± S.E.M. of 4 experiments conducted each in triplicate. Statistical differences were determined by one-way ANOVA.

2008). We therefore evaluated if a pre-incubation of MG-63 cells with HDL₃ was associated with a modification of OxLDL metabolism. To this end, cells were pre-treated with HDL₃ (50-200 µg/ml) for 24 h and thereafter the expression of scavenger receptors of class B, previously shown to be expressed by osteoblastic cells (Brodeur *et al.* 2008), was evaluated. Results presented in figure 4.6 show that HDL₃ do not modulate the expression of CD36 in its mature form (85 kDa). We have also detected a 70 kDa protein (probably another glycosylated form of CD36) that was again not modulated. However, we showed that HDL₃ increased by 1.5 (50 µg/ml) and 1.8 fold (100 and 200 µg/ml) the expression level of SR-BI. To determine if this higher expression of SR-BI has an impact on OxLDL metabolism, selective uptake experiments were conducted. Results presented in figure 4.7 demonstrated that HDL₃ pre-treatment (200 µg/ml for 24 h) had no effect on protein association of M-OxLDL but reduced ¹²⁵I-S-OxLDL association by 30% comparatively to control cells. The ³H-CE association of M-OxLDL was increased by 50% in cells pre-treated with HDL₃, but lipid association of S-OxLDL was not modulated by HDL₃ (Figure 4.7). CE-selective uptake values were also obtained by subtracting protein association data from those of CE. The data obtained indicated that HDL₃ pre-treatment increased the selective uptake of ³H-CE from OxLDL (Figure 4.7). Therefore, these results indicated that HDL₃ modulated OxLDL metabolism by reducing the global uptake in favor of selective uptake of lipids from OxLDL.

3.6. Impact of HDL₃ on lysosomal membrane stability :

To determine if this effect of HDL₃ on OxLDL uptake protects against lysosomal membrane damage, we next stained MG-63 cells with acridine orange. AO is a lysosomotropic weak base and a metachromatic fluorochrome showing red fluorescence at high and green fluorescence at low concentrations. Confocal scanning microscopy presented in figure 4.8 demonstrated fewer red fluorescence spots in the cells exposed to OxLDL, indicating lysosomal membrane damage (Figure

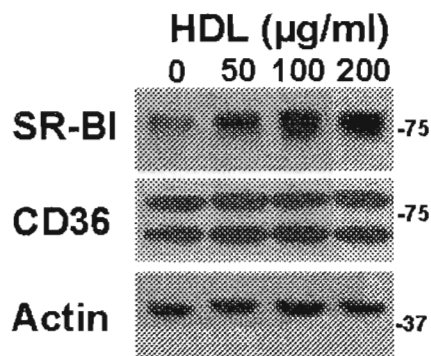


Figure 4.6 : Impact of HDL₃ on SR-BI and CD36 expression in MG-63 cell. MG-63 cells were incubated in the absence or presence of increasing concentrations of HDL₃ (50-200 µg/ml) during 24 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS and then total proteins of osteoblastic cells were extracted as described in Experimental procedures. Representative results are shown for 50 µg of proteins subjected to SDS-PAGE and immunodetection with anti-SR-BI, CD36 or actin antibodies followed by enhanced chemiluminescence revelation.

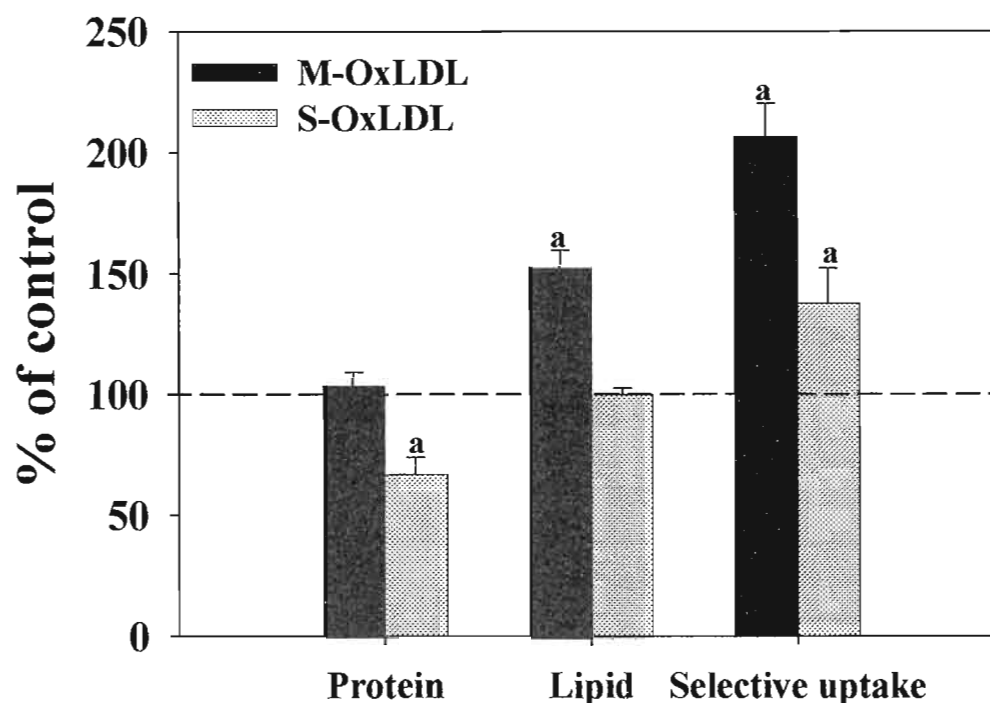


Figure 4.7 : Effect of HDL₃ on ¹²⁵I-lipoprotein association, ³H-CE-lipoprotein association and ³H-CE-lipoprotein association due to cholesteryl ester selective uptake in MG-63 cells. MG-63 cells were incubated in the absence or presence of HDL₃ (200 µg/ml) during 24 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. Then cells were incubated with radiolabeled lipoproteins (20 µg/ml) during 4 h at 37°C in 12-well plates. Nonspecific radioactive lipoprotein association was determined by the addition of unlabeled lipoprotein at 1.5 mg of protein/ml and values were subtracted from total association. ³H-CE-lipoprotein association was calculated as apparent protein association since its specific activity was established as cpm/µg of lipoprotein protein. To determine the amount of CE association due to selective uptake, protein association was subtracted from CE association, both in µg of protein/mg of cell protein. Results are shown as the mean ± S.E.M. of 4 experiments conducted in duplicate. Statistical differences were determined with a *t*-test. ^a Statistically different (*P* < 0.05) from the result obtained with control cells.

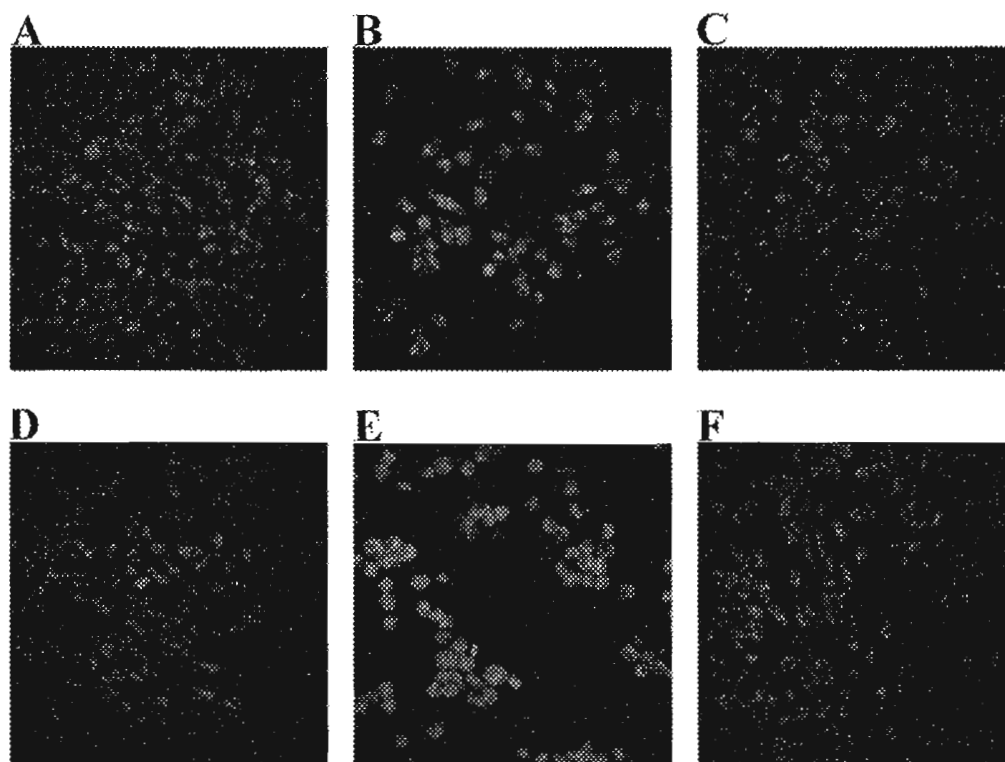


Figure 4.8 : Effect of HDL₃ on OxLDL-induced lysosomal membrane damage. MG-63 cells seeded in LabTek chambers were incubated in the absence (A, B, E) or presence of 200 $\mu\text{g/ml}$ of HDL₃ (C, D, F) during 24 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS, and then incubated with 200 $\mu\text{g/ml}$ of M-OxLDL (B and C) or S-OxLDL (E and F) during 24 h in DMEM-F12 supplemented with 2% LPDS. The cells were then labeled with acridine orange as described in Experimental procedures and examined with a laser scanning confocal (Bio-Rad) microscope (Nikon TE300) with a Plan-Apochromatic 60X oil N.A. 1.4 objective lens.

4.8B and 4.8E) comparatively to control cells incubated in absence of OxLDL (Figure 4.8A and 4.8D). This reduced red staining was accompanied with increased green cytosolic fluorescence, reflecting a lower cytosolic pH due to proton redistribution and thus the trapping of protonized HAO⁺ in the cytosol of damaged cells. However, when cells were pre-treated with HDL₃ (200 µg/ml for 24 h), this reduction of red fluorescence spots induced by OxLDL was abolished (Figure 4.8C and F). Importantly, results also indicated that HDL₃ alone have no impact on lysosomal membrane integrity (Figure 4.8D). Therefore, these results suggest that exposition of cells to HDL₃ prior OxLDL results in the conservation of lysosomal integrity and inhibition of cells death induced by OxLDL

4.DISCUSSION

Growing evidence suggests a link between atherosclerosis and osteoporosis (Barengolts *et al.* 1998 ; Laroche *et al.* 1994 ; Uyama *et al.* 1997), indicating therefore that one or several common factor(s) is (are) responsible for the parallel development of these illnesses. It is well known that LDL become pro-atherogenic after undergoing oxidative modifications, but it is only recently that OxLDL was as well identified as a potential risk factor for osteoporosis. The deleterious action of OxLDL on bone metabolism has been attributed to the stimulation of proliferation and the concomitant inhibition of osteoblastic differentiation (Parhami *et al.* 1997 ; Mody *et al.* 2001), as well as to the cytotoxic effects of OxLDL on osteoblasts (Brodeur *et al.* 2008 ; Hirasawa *et al.* 2007 ; Klein *et al.* 2003), which agree with the reduction of bone formation associated with atherogenic conditions. The likely involvement of OxLDL in the development of osteoporosis was also highlighted by our previous study which demonstrates that osteoblastic cells present binding sites for OxLDL (Brodeur *et al.* 2008). Therefore, the prevention of osteoblast function alterations induced by OxLDL takes great importance in view to eventually prevent the development of osteoporosis associated with atherogenic conditions. Given that

cardiovascular diseases are inversely associated with plasma concentrations of HDL cholesterol (Gordon *et al.* 1998) and as a positive correlation has been found between HDL and bone mineral density (Dennison *et al.* 2007 ; Solomon *et al.* 2005 ; Yamaguchi *et al.* 2002), we evaluated if HDL have the capacity to inhibit the deleterious effects of OxLDL on osteoblastic cells. Our results demonstrated that HDL₃ totally offset MG-63 cell death induced by OxLDL (Figures 4.1 and 4.2) while being without effect per se on osteoblast viability and proliferation.

As the anti-atherogenic property of HDL has been associated with the stimulation of cholesterol efflux for the process of reverse cholesterol transport (Kwiterovich *et al.* 1998) and as the cholesterol efflux by HDL was shown to inhibit macrophage apoptosis (Jiang *et al.* 2006), we first investigated if HDL₃ offset the apoptosis induced by OxLDL by removing cholesterol from osteoblastic cells. Although HDL₃ and β -cyclodextrin have the capacity to accept cholesterol from MG-63 cells, β -cyclodextrin did not protect cells from death induced by OxLDL (Figure 4.4B) which indicates that HDL are not protecting the cells by removing cell cholesterol. Instead, we showed that OxLDL have also the capacity to induce cholesterol efflux (Figure 4.4C). Furthermore, the incubation of osteoblastic cells with OxLDL and β -cyclodextrin led to an increased loss of cell viability, suggesting that enhanced cholesterol efflux occurred upon the treatment. In accordance, we also found that higher concentrations of β -cyclodextrin, which promoted higher cholesterol efflux levels, reduced MG-63 cell viability (Figure 4.4D). Therefore, OxLDL may jeopardize the survival mechanisms of osteoblast by promoting cholesterol efflux (Figure 4.4C) and also may promote the induction of cell death mechanisms by loading cells in oxidized cholesterol that is not processed by the lysosomal system (Brodeur *et al.* 2008), inducing a net decrease in total cell cholesterol availability. As we previously demonstrated that HDL₃ deliver cholesteryl esters to osteoblasts by a selective uptake process (Brodeur *et al.* 2008), it is possible that HDL₃ contribute to

the cell cholesterol homeostasis by delivering cholesterol to MG-63 cells and thereby, consolidate some survival mechanisms which protect the osteoblasts from the apoptosis induced by OxLDL.

As we previously demonstrated the binding and internalization (collectively designated association) of OxLDL by osteoblasts (Brodeur *et al.* 2008), we therefore speculated that part of the protective effect of HDL could result from a competition of the association of OxLDL to osteoblasts. Our data support the competition as the underlying mechanism for HDL protection against cell death induced by OxLDL, since HDL₃ efficiently reduced OxLDL association (Figure 4.3). Moreover, the demonstration that the simultaneous incubation of cells with OxLDL and LDL reduced cell death induced by OxLDL and that LDL significantly displaced OxLDL association further highlighted the importance of OxLDL association (binding and/or internalization) for the cell death action of these oxidized lipoproteins. This is supported by the demonstration that OxLDL cytotoxicity on lymphoid cell lines was shown to be dependent on the amount of OxLDL internalized by cells (Negre-Salvayre *et al.* 1990). OxLDL, HDL and LDL are known ligands for members of the scavenger receptor of class B family such as SR-BI and CD36 (Acton *et al.* 1996 ; Nicholson *et al.* 1995). Notably, we have recently demonstrated that osteoblastic cells express these receptors suggesting that they may be involved in the cell death effect of OxLDL on osteoblasts (Brodeur *et al.* 2008). It should be noted that OxLDL did not induce apoptosis in CD36-negative macrophages (Wintergerst *et al.* 2000). Interestingly, the competition of OxLDL association by HDL and LDL was around 50-60% which may indicate that only these binding sites/receptors are associated with OxLDL cytotoxicity or that the HDL protection may be related in part to the competition of OxLDL association and also to additional mechanisms that could protect the cells from the remaining association.

Although, the mechanism(s) and pathway(s) (receptor(s)) by which OxLDL act on osteoblastic cell viability remain(s) unknown, our current results suggest that the level of SR-BI expression by osteoblastic cells could modify the metabolism of OxLDL and dictate their cytotoxicity. Indeed, we showed that pre-incubation of MG-63 cells with HDL₃ prior to incubation with OxLDL preserve the lysosomal integrity and reduced cell death. This pre-incubation with HDL₃ was correlated with an increase of SR-BI expression (Figure 4.6). At first glance, this protection may appear to be associated with the reduction of OxLDL uptake as it was shown that the SR-BI pathway is less efficient than the CD36 pathway to internalize OxLDL (Sun *et al.* 2007). Indeed, this higher level of SR-BI expression could shift the total cell surface binding of OxLDL to CD36 and SR-BI in favor of SR-BI, and thereby may protect the cells by limiting the entry of OxLDL in osteoblasts as suggested by the protection of lysosomal integrity (Figure 4.8). In accordance, we have demonstrated that the association, a reflection of both binding and internalization, of ¹²⁵I-S-OxLDL with MG-63 cells was reduced. On the other hand, the protein association of M-OxLDL was not affected (Figure 4.7). As our protocol for the determination of OxLDL association does not discriminate between cell surface binding and internalization, it cannot be excluded that, although the association remained similar, there has been a shift of internalization in favor of binding. Despite the concomitant protection of lysosomes and the reduced uptake of OxLDL upon pre-treatment with HDL₃, cells are not protected against cell death induced by S-OxLDL, suggesting that OxLDL cause also their deleterious effect by another or other pathway(s) which remain(s) to be identified in osteoblasts. However, given that in co-incubation of OxLDL and HDL, cells are totally protected despite an incomplete competition of the OxLDL association (Figure 4.3), this lysosomal protection may be involved in the total inhibition of cell death obtained at 48 h in figure 4.1 and 4.2.

We have recently reported that scavenger receptors of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of CE from LDL and HDL₃ (Brodeur *et*

al. 2008). Interestingly, cells exposed to HDL₃ presented higher SR-BI levels and concomitantly became more efficient in CE selective uptake from OxLDL. Therefore, these results indicated that SR-BI is involved in the selective uptake from OxLDL. As lipoproteins were labeled with ³H-CE after oxidation, we cannot evaluate directly the impact of the HDL₃-induced selective uptake of oxidized lipids by cells. Nevertheless, the demonstration that cells are not more susceptible to cell death induced by OxLDL when SR-BI expression is up regulated (Figure 4.8) suggests that SR-BI activity could modify the fate of lipids coming from selective uptake and reduce their cytotoxicity. Indeed, our results showed that cells exposed to HDL₃ are rather protected against cell death induced by M-OxLDL (Figure 4.5) despite an increase of selective uptake, suggesting that the latter process is beneficial. This is supported by the demonstration that death induced by M-OxLDL in cells exposed to HDL₃ was reduced whereas death induced by S-OxLDL in these cells was not prevented, which correlated with the levels of augmentation of selective uptake by (2 and 1.25-fold respectively). Moreover the increase of selective uptake from S-OxLDL was mainly caused by a decrease in the protein association and not by a higher uptake of lipids (Figure 4.7). These results suggest that the increase of CE selective uptake from S-OxLDL is not sufficient in this condition to counterbalance the deleterious effect of S-OxLDL (Figure 4.5). Thus, more investigation is required to determine the possible mechanism of protection afforded by the selective uptake against the cell death induced by OxLDL.

In conclusion this study reveals that HDL₃ have the capacity to inhibit the toxic effect (apoptosis) of OxLDL on osteoblastic cells. This inhibition of apoptosis is related to the displacement by HDL₃ of the OxLDL association to osteoblasts and to the modulation of OxLDL metabolism related to an increase of SR-BI expression. This higher SR-BI expression reduced the global uptake of OxLDL in favor of selective uptake, resulting in the protection against lysosomal membrane damage induced by OxLDL. Therefore, the displacement of OxLDL association and the modulation of

OxLDL metabolism have to be included to the numerous properties of HDL for the protection against OxLDL deleterious effects. It is suggested that HDL may also prevent osteoporosis development.

5.ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research.

CHAPITRE V

DISCUSSION

1.Importance des lipoprotéines dans les fonctions des ostéoblastes :

L'étude de l'impact du cholestérol et plus précisément des lipoprotéines sur le métabolisme osseux est un domaine d'étude récent qui offre de nombreuses perspectives. Ainsi, malgré la nouveauté de ce champ de recherche, quelques études ont déjà démontré que les lipoprotéines ont potentiellement un rôle important à jouer dans le maintien de l'intégrité du tissu osseux. Cette action des lipoprotéines se manifeste notamment par leur habilité à transporter et acheminer différents composés nécessaires aux fonctions des ostéoblastes. En effet, il y a une accumulation de données qui indiquent que les lipides de la diète transportés par les lipoprotéines jouent un rôle important dans les différentes activités des ostéoblastes. Quelques études ont ainsi démontré qu'un supplément d'acide gras à longue chaîne assure une certaine protection contre la perte osseuse dans des modèles de rongeurs ovariectomisés (Kruger *et al.* 1999 ; Sun *et al.* 2003). En plus des lipides, les résultats de quelques études indiquent que les lipoprotéines ont la fonction d'acheminer la vitamine K aux cellules ostéoblastiques afin d'assurer la carboxylation de l'ostéocalcine et ainsi permettre à cette dernière de prévenir une formation osseuse excessive (Newman *et al.* 2002 ; Niemeier *et al.* 2005 ; Schilling *et al.* 2004). L'ensemble de ces études indiquent donc que les lipoprotéines jouent un rôle primordial dans le métabolisme osseux. Cependant, malgré le fait que les LDL et les HDL constituent deux classes de lipoprotéines les plus abondantes dans la circulation, à ce jour il n'existait aucune étude concernant le métabolisme des LDL et des HDL par les ostéoblastes. De plus, tout comme les chylomicrons, ces lipoprotéines sont reconnues pour transporter des lipides et des vitamines nécessaires aux fonctions des ostéoblastes. Il devenait ainsi important d'étudier le métabolisme de ces lipoprotéines par les cellules ostéoblastiques.

Les résultats obtenus dans la présente étude indiquent pour la première fois que les ostéoblastes sont en mesure de capter et d'effectuer le métabolisme du cholestérol des LDL et des HDL. Ce métabolisme se fait d'une part par un phénomène de captation globale, tel que démontré par la dégradation de ces lipoprotéines (Figure 2.2A). Cette dégradation des LDL se produisant probablement suite à leur internalisation par l'intermédiaire du rLDL. En effet, les données des essais de liaison indiquent la présence d'un site de liaison de haute affinité (Table 2.1) qui a auparavant été associé aux rLDL dans les cellules HepG2 (Rhainds *et al.* 1999). De plus, il a été rapporté par le groupe de Heeren (2005) que les cellules ostéoblastiques expriment ce récepteur. En accord avec eux, nous avons aussi démontré l'expression de ce récepteur dans les cellules MG-63 (données non-montrées). Cependant, il serait important de documenter l'implication réelle du rLDL dans la captation globale des LDL par les ostéoblastes. Pour ce faire, il suffirait de générer des cellules ostéoblastiques sous-exprimant ce récepteur ou bien d'utiliser des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de souris déficientes en rLDL. À l'aide de ces modèles cellulaires, il deviendrait ainsi possible de déterminer la contribution de ce récepteur dans la prise des LDL par la réalisation d'essais d'association et de dégradation protéique.

Les résultats provenant des essais de captation sélective démontrent que la captation globale n'est pas le seul processus permettant l'acheminement du cholestérol aux cellules ostéoblastiques. En effet, la figure 2.2D montre bien que l'ensemble des modèles cellulaires ostéoblastiques utilisés sont en mesure de prendre sélectivement les EC à partir des LDL et des HDL. Étant donné que ce processus de captation sélective a antérieurement été associé à l'activité des SR-B (Brodeur *et al.* 2005 ; Connelly *et al.* 2003 ; Luangrath *et al.* 2008), notre intérêt s'est porté vers ces récepteurs. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois que les ostéoblastes expriment différents membres de cette famille de récepteurs, soit le SR-BI, le SR-BII et le CD36 (Figure 2.3). De plus, la démonstration par l'utilisation des gradients de

sucrose que ces récepteurs sont retrouvés dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique suggère que ces récepteurs sont fonctionnels, puisqu'ils sont présents à la membrane et peuvent ainsi interagir avec les lipoprotéines (Figure 2.4). Enfin, les résultats de compétition ont permis de confirmer cette fonctionnalité. En effet, par l'utilisation de LDLOx qui sont reconnues pour être des ligands des SR-B, nous avons démontré que ces lipoprotéines modifiées compétitionnent environ 50% de l'association protéique des LDL et des HDL (Figure 2.1). Cette compétition par les LDLOx s'associe à une baisse de plus de 60% de la captation sélective des EC faite à partir des lipoprotéines natives (Figure 2.5). Ainsi, l'ensemble de ces données indique que le processus de captation sélective au niveau ostéoblastique se produit majoritairement par l'intermédiaire des SR-B. Cependant, ces résultats ne donnent aucune information quant à la contribution relative de chacun des SR-B. Ainsi, il devient maintenant important de quantifier cette contribution. Pour ce faire, il faudrait dans l'avenir générer des cellules ostéoblastiques qui sous expriment soit le SR-BI ou bien le CD36. Il est toutefois possible qu'en absence de l'un, l'autre puisse compenser. En effet, le groupe de madame Brissette a démontré par l'utilisation de souris déficientes en SR-BI, qu'il existe un mécanisme permettant de compenser pour la perte de captation sélective se faisant par le SR-BI (Brodeur *et al.* 2005). De plus, le groupe de madame Brissette a récemment montré à l'aide de souris doublement déficientes en SR-BI et CD36 que ce dernier était responsable de ce mécanisme de compensation (Luangrath *et al.* 2008). Ainsi, il devient également important de générer des ostéoblastes sous exprimant ces deux récepteurs. Une autre approche possible consisterait à utiliser des cultures primaires provenant de souris qui n'expriment pas ces récepteurs.

1.1.Implication du métabolisme des lipoprotéines dans les fonctions ostéoblastiques :

Il a été démontré que l'acheminement du cholestérol via les lipoprotéines est primordial pour les ostéoclastes. En effet, il est maintenant connu qu'en absence de

LDL, il ne peut y avoir fusion des précurseurs des ostéoclastes et ainsi, par le fait même, pas de génération d'ostéoclastes matures aptes à dégrader la matrice osseuse (Sato *et al.* 1998). De plus, la survie des cellules ostéoclastiques est compromise lorsque ces dernières ne sont pas exposées aux LDL. Cet effet résulte du fait que la capacité de biosynthèse de cholestérol par ces cellules est faible (Luegmayr *et al.* 2004). Cette moindre production de cholestérol explique également la mort des ostéoclastes lors d'une exposition à des HDL, qui en induisant l'efflux de cholestérol entraînent une diminution fatale du cholestérol cellulaire qui ne peut être remplacé par la synthèse cellulaire (Luegmayr *et al.* 2004). Ainsi, ces données suggèrent d'une part la nécessité d'un acheminement suffisant de cholestérol aux ostéoclastes par l'intermédiaire des LDL ainsi que le maintien d'un équilibre entre les niveaux de HDL et de LDL afin de conserver une activité ostéoclastique adéquate. Cependant, les résultats obtenus dans le présent projet semblent indiquer que contrairement aux ostéoclastes, l'apport de cholestérol via les lipoprotéines est moins important pour la survie des ostéoblastes. En effet, nos résultats montrent qu'en absence de LDL ou de HDL, les cellules ostéoblastiques ne présentent aucun signe d'évènements apoptotiques (Figure 3.4 et Figure 4.2). De plus, à l'opposé des résultats obtenus avec les ostéoclastes, nous avons démontré que la présence de HDL n'a pas d'effet sur la viabilité des ostéoblastes (Figure 4.2) et cela malgré le fait que ces HDL soient en mesure d'induire le processus d'efflux de cholestérol (Figure 4.4). On peut donc présumer que l'efflux de cholestérol induit par les HDL est compensé par leur capacité de transférer sélectivement leur cholestérol aux ostéoblastes et ainsi assurer que l'homéostasie du cholestérol ostéoblastique soit maintenue. De plus, il a été démontré que l'efflux de cholestérol causé par la présence de cyclodextrine entraîne une augmentation de l'expression de la HMGCoA réductase (enzyme impliquée dans la synthèse du cholestérol) au niveau des ostéoblastes (Luegmayr *et al.* 2004). Ainsi, il est possible que les HDL aient un effet similaire, permettant ainsi de maintenir des niveaux de cholestérol adéquats pour assurer la survie des ostéoblastes. L'ensemble

de ces données suggère donc que l'apport de cholestérol via les lipoprotéines n'est pas essentiel à la survie des cellules ostéoblastiques.

L'acheminement du cholestérol aux ostéoblastes par les lipoprotéines pourrait toutefois assurer d'autres fonctions associées aux ostéoblastes. L'une d'elle pourrait être d'assurer la migration des ostéoblastes vers la surface osseuse. En effet, notre groupe a récemment démontré qu'en présence de LDL, il y a une forte augmentation de la migration des cellules MG-63 (Hamel *et al.* 2008). Cette induction de la migration par les LDL a également été rapportée au niveau des SMC (Damirin *et al.* 2007). Cette augmentation de la motilité des SMC exposées aux LDL serait causée par la présence d'acide lysophosphatidique (LPA) à l'intérieur de ces lipoprotéines natives. De plus, il a été démontré que le LPA induit la migration des cellules MC3T3-E1 (Masiello *et al.* 2006). Ainsi, on peut présumer que les LDL sont en mesure d'induire la migration des ostéoblastes par l'intermédiaire des molécules de LPA qu'elles transportent. Cependant, bien que ce mécanisme ait été démontré au niveau des SMC, il serait important de mieux caractériser l'importance de la présence de LPA dans l'effet migratoire induit par les LDL sur les ostéoblastes. Il serait également intéressant de déterminer si les HDL ont la capacité d'induire la migration des ostéoblastes, puisqu'un tel effet migratoire des HDL a déjà été démontré au niveau des cellules endothéliales (Seetharam *et al.* 2005). Cependant, cette induction de la migration par les HDL semble être dépendante du type cellulaire, puisqu'il a été rapporté que les HDL inhibent la migration des SMC (Damirin *et al.* 2007). Par contre, ces effets sur la migration des ostéoblastes se rapportent davantage à la capacité des lipoprotéines à transporter différents lipides bioactifs qui agissent par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques et le lien avec l'utilité du métabolisme du cholestérol par les ostéoblastes est moindre dans cette optique.

Ainsi, l'importance du métabolisme des lipoprotéines par les ostéoblastes pourrait provenir des études utilisant les statines. Ces études ont démontré que l'inhibition de

la biosynthèse du cholestérol au niveau des ostéoblastes par l'utilisation de statines favorise la différenciation de ces derniers et ainsi la formation osseuse. En effet, il a été démontré *in vitro* que les statines induisent une hausse de l'activité de la phosphatase alcaline et de la minéralisation (Maeda *et al.* 2001 ; Sugiyama *et al.* 2000). De plus, il a aussi été démontré que l'administration locale de statines à des souris augmente l'épaisseur du calvarium de ces dernières (Garrett *et al.* 2002). Il a également été rapporté que l'administration orale de statines à des rats cause une hausse de la densité minérale osseuse (Oxlund *et al.* 2000 ; Wilkie *et al.* 2000). Cependant, il est important de mentionner que cette induction de la différenciation ostéoblastique et de la formation osseuse n'est pas attribuée à l'absence de synthèse de cholestérol. En effet, l'action des statines au niveau des ostéoblastes a plutôt été associée à une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la protéine morphogénique de l'os (BMP) qui est une protéine reconnue pour induire la différenciation ostéoblastique. Cette hausse des BMP serait causée par l'inhibition des différents intermédiaires impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (Maeda *et al.* 2001 ; Sugiyama *et al.* 2000). Malgré tout, il demeure que cette hausse de la différenciation ostéoblastique induite par les statines se produit en absence de synthèse cholestérol. Ainsi, il est possible d'envisager que la différenciation ostéoblastique nécessite l'inhibition de ces intermédiaires et par conséquent l'inhibition de la synthèse du cholestérol. Dans cette optique, il faut alors considérer que les besoins en cholestérol des ostéoblastes demeurent et que l'acheminement du cholestérol aux ostéoblastes par l'intermédiaire des lipoprotéines pourrait être essentiel lors de la différenciation de ces cellules. Ceci constitue donc un aspect très important qui devra être abordé dans l'avenir.

1.2.Implication des lipoprotéines dans l'acheminement de l'oestrogène aux ostéoblastes :

Tel que mentionné précédemment, l'importance des lipoprotéines dans le métabolisme osseux repose sur leur habilité à transporter différents agents nécessaires

aux fonctions des cellules ostéoblastiques. Jusqu'à présent, les recherches ont essentiellement porté sur l'acheminement aux ostéoblastes de la vitamine K par les lipoprotéines. Cependant, les lipoprotéines peuvent également transporter d'autres composants nécessaires aux ostéoblastes. En effet, il est maintenant connu que l'oestrogène peut être transporté par les lipoprotéines et plus particulièrement par les HDL, mais aussi les LDL (Helisten *et al.* 2001 ; Leszczynski *et al.* 1990 ; Tang *et al.* 1997). Cette capacité des lipoprotéines à transporter l'oestrogène pourrait être non négligeable pour le métabolisme osseux étant donné le rôle important que joue cette hormone dans le maintien de la masse osseuse. En effet, il est bien documenté que la déficience en oestrogène cause une perte osseuse rapide et sévère (Bilezikian *et al.* 1998 ; Riggs *et al.* 1998). Les effets protecteurs de l'estrogène sur l'os ont surtout été attribués à une inhibition de la résorption osseuse (Tobias *et al.* 1999) ; cette inhibition de la dégradation de la matrice osseuse provenant en partie de l'action de l'oestrogène sur les ostéoblastes. En effet, l'oestrogène cause une baisse de la production de cytokines ostéoclastogénique par les ostéoblastes et aussi une hausse des facteurs inhibant l'ostéoclastogénèse (Manolagas et Jilka 1995 ; Spelsberg *et al.* 1999 ; Saika *et al.* 2001). De plus, l'oestrogène peut également favoriser directement la formation osseuse. À cet effet, il a été démontré que l'oestrogène induit la différenciation des cellules ostéoblastiques (Dang *et al.* 2002). Cette action ostéogénique a également été montrée chez des souris ayant reçu de fortes doses d'oestrogène (Samuels *et al.* 1999). De plus, l'administration de doses relativement élevées et de manière prolongée à des femmes en post-ménopause a également démontré un effet ostéogénique de l'oestrogène (Bord *et al.* 2000). Ainsi, étant donné l'absence de documentation concernant les mécanismes permettant l'acheminement de l'oestrogène aux tissus osseux, nous avons entrepris de déterminer si les lipoprotéines pouvaient être impliquées dans ce transport de l'oestrogène aux cellules ostéoblastiques.

Les résultats obtenus démontrent clairement que les LDL et les HDL sont en mesure de transférer de manière sélective aux ostéoblastes l'oestrogène qu'elles contiennent (Figure 2.6). Nous avons également montré que les récepteurs SR-B sont responsables de cette captation sélective de l'oestrogène, puisque la présence des LDLOx (ligands des SR-B) inhibe le transfert de l'oestrogène des lipoprotéines vers les ostéoblastes (Figure 2.6). Cependant, tout comme la captation sélective des EC, ces résultats ne permettent pas de quantifier la contribution relative des différents SR-B. Ainsi, il devient nécessaire d'utiliser des cellules sous-exprimant ces récepteurs afin de déterminer l'importance de chacun de ces SR-B dans la prise de l'oestrogène à partir des lipoprotéines. Toutefois, puisqu'il a été montré au niveau des cellules endothéliales (Gong *et al.* 2003) et des cellules HepG2 (Badeau *et al.* 2007) que le SR-BI est impliqué dans la captation sélective de l'oestrogène contenu dans les HDL, il est fort probable que cela soit également le cas au niveau ostéoblastique. Une autre stratégie afin de déterminer l'implication du SR-BI serait de déterminer à l'aide de souris déficientes pour ce récepteur si l'injection d'oestrogène peut également provoquer un effet ostéogénique comparable à des souris normales. Il devient aussi important de déterminer si cette oestrogène transmise aux ostéoblastes peut être biologiquement active et ainsi assurer les différents effets ostéogéniques qui ont été associés à l'oestrogène. Pour ce faire, il suffirait de déterminer l'activité transcriptionnelle des récepteurs à l'estrogène par l'intermédiaire d'une construction contenant un gène rapporteur luciférase couplé à l'élément de réponse des récepteurs à l'oestrogène.

2.Impact des lipoprotéines dans le développement de l'ostéoporose :

Les lipoprotéines ont également un rôle à jouer dans le développement de l'ostéoporose. En effet, il y a un certain nombre d'études épidémiologiques qui démontrent qu'il y a une corrélation entre le développement de l'athérosclérose et de l'ostéoporose (Barengolts *et al.* 1998 ; Shiraki *et al.* 1997 ; Uyama *et al.* 1997). Le

développement parallèle de ces deux pathologies suggère donc qu'il pourrait y avoir des facteurs communs qui sont responsables de l'apparition de ces deux troubles physiologiques. Étant donné qu'il est maintenant connu que les LDL deviennent pro-athérogéniques suite à une modification oxydative (Steinberg *et al.* 1997), il a été suggéré que ces lipoprotéines modifiées (LDLOx) pourraient être également responsables du développement de l'ostéoporose chez les patients présentant des niveaux élevés de cholestérol. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que des souris mises sous diète athérogénique présentent une réduction de la formation osseuse (Parhami *et al.* 2001). De plus, certaines études ont rapporté que l'administration de statines, reconnues pour diminuer le cholestérol plasmatique, entraîne une hausse de la formation osseuse et également une réduction des risques de fractures (Edwards *et al.* 2000 ; Meier *et al.* 2000 ; Schoofs *et al.* 2004). Le groupe de Tintut (2004) a aussi montré qu'il y a une hausse des hydroperoxydes lipidiques au niveau de la moelle osseuse de souris sous diète athérogénique. Le rôle des LDLOx dans le développement de l'ostéoporose a plus précisément été mis en valeur par des études portant sur l'impact des LDLOx sur la différenciation ostéoblastique. Ainsi, ces études ont montré que les LDLOx induisent une inhibition de la différenciation ostéoblastique (Parhami *et al.* 1997 ; Mody *et al.* 2001). Cette inhibition de l'ostéoblastogénèse résulte en une hausse dans la génération des adipocytes qui proviennent des mêmes précurseurs cellulaires que les ostéoblastes (Parhami *et al.* 1999). Cette implication des LDLOx dans le développement de l'ostéoporose est aussi appuyée par la démonstration que les LDLOx affectent la survie cellulaire des ostéoblastes (Hirasawa *et al.* 2007 ; Klein *et al.* 2003). L'ensemble de ces études indiquent donc que les lipoprotéines et plus particulièrement les LDLOx ont un impact sur le métabolisme osseux et sont en partie responsables de l'ostéoporose. Cependant, les mécanismes menant à l'apparition de l'ostéoporose demeurent encore très obscurs. Ainsi, suite à la démonstration par notre groupe que les ostéoblastes expriment des récepteurs ayant la capacité de lier les LDLOx (Figure 2.3), nous avons entrepris l'étude du métabolisme de ces lipoprotéines par les ostéoblastes afin de

mieux comprendre les différents effets qu'ont les LDLOx sur les fonctions ostéoblastiques.

2.1.Détermination de la capacité des ostéoblastes à effectuer le métabolisme des LDLOx :

Les résultats obtenus montrent que les ostéoblastes sont en mesure de prendre sélectivement les EC contenus dans les LDLOx (Figure 3.1). La présence de ce phénomène de captation sélective est donc en accord avec l'expression du SR-BI par les cellules ostéoblastiques. En effet, le groupe de madame Brissette a également rapporté que les LDLOx peuvent se lier aux cellules HepG2, et que cette liaison est inhibée par d'autres ligands du SR-BI (Rhainds *et al.* 1999). Dans cette même étude, il a aussi été rapporté que les EC des LDLOx peuvent être captés sélectivement suite à leur incubation avec des cellules HepG2. Puisque cette captation sélective des EC est réduite lorsque les LDL modifiées marquées sont co-incubées avec des HDL, LDL, BSA maléylée, il a été suggéré que les SR-BI et/ou le CD36 est/sont impliqué(s) dans la captation sélective des EC provenant des LDLOx (Rhainds *et al.* 1999). Enfin, plus récemment, dans une étude à laquelle j'ai contribué durant ce doctorat, le groupe de madame Brissette a montré que le SR-BI des cellules non-parenchymateuses hépatiques est responsable de la captation sélective faite à partir des LDL fortement oxydées (Bourret *et al.* 2006). La possibilité que le SR-BI soit responsable de ce processus de prise sélective à partir des LDLOx au niveau des ostéoblastes est également mise en valeur par les résultats obtenus suite à des pré-incubations des ostéoblastes avec des HDL. En effet, nous avons montré que des cellules MG-63 exposées aux HDL durant 24 hrs montrent une hausse de l'expression de SR-BI (Figure 4.6) et que cette augmentation du SR-BI est corrélée avec une hausse de la captation sélective faite à partir des LDLOx (Figure 4.7). Cependant, afin d'établir la contribution relative de ce récepteur dans la captation sélective à partir des LDLOx, il faudra dans l'avenir avoir recours à des ostéoblastes qui sous

expriment le SR-BI ou bien à des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de souris déficientes pour ce récepteur.

Les résultats obtenus montrent que les ostéoblastes métabolisent également les LDLOx par l'intermédiaire d'un processus de captation globale. En effet, les données présentées à la figure 3.1 montrent la présence d'une association protéique qui résulte dans la dégradation de la particule oxydée. Cette prise des LDLOx pourrait également provenir de l'activité du SR-BI, puisqu'il a été démontré à l'aide de cellules CHO sur-exprimant le SR-BI que ce dernier peut mener à l'internalisation des LDLOx (Gillotte-Taylor *et al.* 2001). De plus, nous avons montré que des ligands du SR-BI, tels que les LDL et les HDL diminuent l'association protéique des LDLOx aux ostéoblastes (Figure 4.3). Par contre, il s'avère qu'au niveau des ostéoblastes, la captation globale via le SR-BI est peu probable. En effet, nos résultats montrent que malgré une hausse d'expression du SR-BI suite à une exposition des cellules MG-63 à des HDL, il n'y a pas de hausse d'association protéique (Figure 4.7). Ainsi, un autre candidat à cette prise des LDLOx est le CD36 qui est également exprimé par les cellules ostéoblastiques (Figure 2.3). La possible implication de ce récepteur dans la prise des LDLOx est appuyée par la démonstration que le CD36 exprimé par les macrophages est un récepteur important dans la prise des LDLOx (Nozaki *et al.* 1995 ; Podrez *et al.* 2000). De plus, avec ma collaboration, le groupe de madame Brisette a montré récemment par l'intermédiaire de souris déficiente en CD36 que ce dernier est impliqué dans la clairance plasmatique des LDLOx (Luangrath *et al.* 2008). Ainsi, afin d'établir la contribution de ce dernier dans la prise des LDLOx par les ostéoblastes, il faudra avoir recours à des ostéoblastes qui sous-expriment ce récepteur.

2.2. Impact du métabolisme des LDLOx sur la survie des ostéoblastes :

Il est ici important de noter que la dégradation des LDLOx demeure relativement faible lorsque comparée avec celle des LDL natives (Figure 3.1). En accord avec

cette faible efficacité de dégradation, différentes études ont démontré que le cholestérol ainsi que la partie protéique des LDLOx s'accumulent à l'intérieur des lysosomes des macrophages (Podrez *et al.* 1994 ; Jessup *et al.* 1992). Cette accumulation est le résultat d'une incapacité de la part des enzymes lysosomales à hydrolyser ou dégrader les différents composants des LDLOx (Lougheed *et al.* 1991). Ainsi, cette faible dégradation des LDLOx par les ostéoblastes suggère que ces lipoprotéines s'accumulent dans les lysosomes et pourraient ainsi causer des effets cytotoxiques pour les ostéoblastes. Nous avons ainsi entrepris d'étudier les effets que peuvent avoir les LDLOx sur la viabilité des cellules ostéoblastiques.

Les résultats obtenus démontrent que les LDLOx induisent la prolifération des ostéoblastes lorsque ces derniers sont exposés à de faibles concentrations de lipoprotéines oxydées. En effet, on remarque une hausse de l'activité MTT (Figure 3.2) et également une augmentation de l'incorporation de thymidine (Figure 3.3) lorsque des cellules MG-63 sont exposées à de faibles concentrations de LDLOx. En accord avec ce résultat, le groupe de Demer a montré que la présence de LDLOx augmente l'incorporation de thymidine par les cellules MC3T3-E1 et diminue en parallèle leur différenciation ostéoblastique (Parhami *et al.* 1997). Ainsi, l'induction de la prolifération par les LDLOx s'accompagne d'une inhibition d'une des fonctions principales des LDLOx. D'ailleurs, il a été rapporté que l'induction des gènes associés avec la minéralisation et donc la formation osseuse est accompagnée par une réduction de la prolifération des cellules ostéoblastiques (Owen *et al.* 1990 ; Stein *et al.* 1990). Donc, en induisant la prolifération des ostéoblastes, les LDLOx entraînent une diminution de la différenciation et de la capacité de formation osseuse, ce qui pourrait contribuer au développement de l'ostéoporose. Cependant, ces résultats n'apportent aucune information concernant les mécanismes qui mènent à la prolifération des ostéoblastes sous l'influence des LDLOx. Ainsi, cet aspect devra être éventuellement abordé afin de pouvoir établir des cibles thérapeutiques qui pourraient permettre d'éviter cet effet mitogénique causé par les LDLOx.

Les résultats indiquent également que les LDLOx n'ont pas pour seul effet d'induire la prolifération. En effet, nous avons montré qu'à de fortes concentrations les LDLOx entraînent la mort des cellules ostéoblastiques par l'intermédiaire d'un mécanisme d'apoptose (Figure 3.4). Étant donné la démonstration que les ostéoblastes dégradent peu les LDLOx (Figure 3.1) et que la prise cellulaire de ces lipoprotéines est reconnue pour être un mécanisme important dans l'induction des effets toxiques (Li, Yuan et Brunk, 1998), nous avons étudié l'importance de ce faible métabolisme des LDLOx dans la mort des ostéoblastes. Les résultats obtenus indiquent que cette moindre capacité des ostéoblastes à dégrader les LDLOx est effectivement responsable, du moins en partie, de la mort induite par la présence de ces lipoprotéines modifiées. En effet, par un marquage des cellules à l'acridine orange, nous avons montré que les LDLOx entraînent une perméabilisation de la membrane des lysosomes (Figure 3.5). Certaines études ont démontré que la perte d'intégrité lysosomale est liée à la mort cellulaire qui est causée par la libération dans le cytoplasme des enzymes lysosomales (Boya *et al.* 2003 ; Li, Yuan, Olsson *et al.* 1998). Ainsi, afin de confirmer l'importance de cette accumulation lysosomale des LDLOx dans les effets cytotoxiques de ces dernières, nous avons eu recours à la chloroquine qui est un agent qui inhibe l'activité lysosomale. Les résultats indiquent que la présence de la chloroquine accentue la mort cellulaire induite par les LDLOx (Figure 3.6), ce qui suggère que l'inhibition de l'activité de dégradation lysosomale des LDLOx favorise la perméabilisation de la membrane des lysosomes, et par conséquent, la libération cytoplasmique des enzymes lysosomales. Ce processus est également appuyé par les résultats provenant de la pré-incubation des cellules MG-63 avec des HDL. En effet, à l'aide de ces expériences, nous avons montré que l'exposition des ostéoblastes à des HDL diminue l'association protéique des LDLOx (Figure 4.7), ce qui résulte en une préservation de l'intégrité lysosomale (Figure 4.8) qui est associée avec une inhibition de la mort cellulaire induite par les LDLOx (Figure 4.5). L'ensemble de ces données indique donc que l'incapacité des ostéoblastes à effectuer le métabolisme des LDLOx est responsable de la mort induite

par ces lipoprotéines. Malgré que les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort induite par une perméabilisation des lysosomes demeurent encore peu connus, il devient tout de même intéressant de mieux caractériser les différents événements qui participent à cette voie d'apoptose lysosomale.

La démonstration que l'internalisation des LDLOx est impliquée dans la mort des cellules ostéoblastiques indique également l'importance de s'intéresser aux voies permettant cette prise des LDLOx. Ainsi, étant donné que nous avons montré que les SR-B sont responsables d'une certaine proportion de l'association des LDLOx aux ostéoblastes (Figure 2.1 et 4.3), ces récepteurs constituent des candidats qui pourraient potentiellement être impliqués dans la mort induite par l'internalisation des LDLOx. Les données obtenues suggèrent toutefois que le SR-BI n'est pas le SR-B qui est responsable de l'apoptose causée par les LDLOx. En effet, la démonstration qu'une hausse d'expression du SR-BI (Figure 4.6) causée par l'exposition des cellules à des HDL est accompagnée d'une protection contre l'effet apoptotique induit par les LDLOx (Figure 4.5), suggère fortement que l'expression du SR-BI permet plutôt de contrer l'action cytotoxique des LDLOx. Cet effet protecteur du SR-BI pourrait provenir du fait qu'il a été démontré que le SR-BI est moins efficace que le CD36 pour internaliser les LDLOx (Sun *et al.* 2007). Ainsi, une augmentation de l'expression du SR-BI pourrait faire en sorte de réduire l'entrée des LDLOx en déplaçant la liaison des LDLOx du CD36 vers le SR-BI. D'ailleurs, nous avons démontré que la hausse d'expression du SR-BI s'accompagne d'une réduction de l'association protéique des LDLOx (Figure 4.7), ce qui suggère une diminution de l'internalisation de ces lipoprotéines. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer cet effet protecteur du SR-BI réside dans la démonstration que l'augmentation de l'expression du SR-BI s'accompagne également d'une hausse de la captation sélective des EC des LDLOx (Figure 4.7). À première vue, cette hausse de prise des lipides à partir des LDLOx pourrait suggérer une augmentation de l'entrée de produits nocifs dans les cellules et ainsi une hausse au niveau de la cytotoxicité et non

une protection telle qu'obtenue à la figure 4.5. Ainsi, ces résultats pourraient suggérer que l'activité du SR-BI permet de diriger le cholestérol vers des compartiments autres que les lysosomes et d'assurer une diminution de l'accumulation du cholestérol dans ces compartiments. À cet effet, il a été démontré que les EC des HDL pris par l'intermédiaire du SR-BI sont en partie hydrolysés à l'extérieur des lysosomes (Acton *et al.* 1996 ; Rhainds *et al.* 1999). De plus, le groupe madame Brissette a montré que 68% des EC provenant des LDLOx sont hydrolysés dans les lysosomes (Rhainds *et al.* 1999). Ainsi, il est possible que dans les ostéoblastes, les lipides des LDLOx pris par l'intermédiaire du SR-BI soient dirigés vers un compartiment qui permet d'hydrolyser ces lipides toxiques plus efficacement ou au moins de faire en sorte de protéger les cellules de ces lipides bioactifs. Il faudra donc dans l'avenir déterminer plus précisément les mécanismes qui permettent au SR-BI de protéger les ostéoblastes contre la mort induite par les LDLOx.

Le CD36, qui est aussi exprimé par les ostéoblastes (Figure 2.3), est un autre récepteur capable d'internaliser les LDLOx. Ainsi, ce dernier pourrait être le SR-B qui est responsable de l'apoptose induite par les LDLOx. D'ailleurs, il a été démontré que le CD36 est impliqué dans la prise des LDLOx au niveau des macrophages (Nozaki *et al.* 1995 ; Podrez *et al.* 2000) et que l'inhibition de cette prise entraîne une réduction de l'apoptose causée par les LDLOx (Wintergerst *et al.* 2000). Il s'avère donc important de déterminer l'importance de ce récepteur dans l'induction de la mort des cellules ostéoblastiques exposées à des LDLOx. Pour ce faire, il faudrait utiliser, soit des cellules sous-exprimant ce récepteur ou avoir recours à des anticorps bloquant le CD36. Enfin, il sera primordial de déterminer *in vivo* l'impact que peuvent avoir le SR-BI et le CD36 dans le développement de l'ostéoporose causé par des conditions athérogéniques. Pour y arriver, il faudra utiliser des souris déficientes pour ces récepteurs et mettre ces dernières sous une diète athérogénique. Par la suite, les os de ces souris pourraient être utilisés en vue de déterminer si le

nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes est modifié par la diète. De plus, la densité minérale osseuse pourrait également être évaluée afin de déterminer si l'absence de ces récepteurs prévient la réduction de la formation osseuse causée par une diète athérogénique.

3.Impact des HDL sur le métabolisme osseux :

Tel que mentionné précédemment, les HDL sont reconnues pour assurer une protection contre le développement des maladies cardio-vasculaires (Gordon *et al.* 1998). Cette action protectrice est attribuable à de nombreuses propriétés que possèdent ces lipoprotéines, telles que la capacité d'induire l'efflux de cholestérol (Kwiterovich *et al.* 1998), d'inhiber l'oxydation des LDL (Navab *et al.* 2004) et aussi d'inhiber les différentes voies de signalisation cellulaires qui sont induites par les LDLOx (Lee *et al.* 2005 ; Robbesyn *et al.* 2003 ; Schmidt *et al.* 2006 ; Suc *et al.* 1997). Cependant, l'effet des HDL au niveau du tissu osseux a reçu bien peu d'attention comparativement à l'action des LDL. Certaines études ont toutefois indiqué que les HDL peuvent exercer un effet protecteur contre le développement de l'ostéoporose. En effet, il a été démontré que les HDL induisent l'apoptose au niveau des ostéoclastes (Luegmayr *et al.* 2004). Cette mort serait causée par la capacité que les HDL ont d'induire l'efflux de cholestérol, puisque les ostéoclastes n'ont pas une assez grande capacité de biosynthèse de cholestérol pour compenser cette perte. Ainsi, on peut présumer qu'*in vivo*, la présence de HDL entraîne une réduction du processus de résorption osseuse en diminuant le nombre d'ostéoclastes aptes à dégrader la matrice osseuse. De plus, certaines études ont aussi montré qu'il y a une corrélation positive entre les niveaux de HDL plasmatiques et la densité minérale osseuse (Dennison *et al.* 2007 ; Solomon *et al.* 2005 ; Yamaguchi *et al.* 2002). Ainsi, dans le cadre de ce projet, nous avons porté notre intérêt vers la capacité des HDL à inhiber les effets toxiques des LDLOx. De plus, étant donné la démonstration de l'importance du métabolisme des LDLOx dans l'induction de l'apoptose des

ostéoblastes (Chapitre III), nous avons cherché à déterminer si les HDL ont la capacité de modifier ce métabolisme.

3.1.Effet protecteur des HDL sur la mort ostéoblastique induite par les LDLOx :

Les résultats obtenus démontrent que les HDL ont effectivement la capacité d'inhiber l'apoptose causée par l'exposition des ostéoblastes aux LDLOx (Figure 4.2). De plus, nous avons montré que cette protection est au moins en partie due à une modulation du métabolisme des LDLOx. En effet, les expériences de compétition montrent que les HDL ont la capacité d'empêcher l'association des LDLOx aux ostéoblastes (Figure 4.3), ce qui suggère que l'internalisation des LDLOx est nécessaire pour l'induction de ce processus d'apoptose. De plus, l'importance de la modulation du métabolisme des LDLOx a aussi été mise en valeur par des expériences où les ostéoblastes ont été pré-incubés avec des HDL avant d'être exposés aux LDLOx. Les résultats démontrent que cette pré-incubation prévient la mort cellulaire causée par les LDLOx (Figure 4.5) et que cette protection provient d'une diminution de la prise de ces lipoprotéines modifiées (Figure 4.7), ce qui permet de maintenir l'intégrité de la membrane des lysosomes (Figure 4.8). Cette diminution de l'internalisation des LDLOx se fait en faveur d'une hausse de la captation sélective (Figure 4.7) qui provient d'une hausse concomitante de l'expression du SR-BI (Figure 4.6). L'ensemble de ces résultats indique donc que les HDL peuvent exercer un effet protecteur contre la présence de conditions athérogéniques et cela par la modulation du métabolisme des LDLOx.

3.2.Autres mécanismes potentiellement impliqués dans la protection apportée par les ostéoblastes :

Les HDL possèdent plusieurs autres propriétés qui pourraient être responsables de cet effet protecteur. L'une de ces propriétés réside dans le fait que les HDL sont en mesure de transporter des antioxydants, tel que la vitamine E qui peut inhiber l'apoptose induite par les LDLOx au niveau des cellules endothéliales (Vieira *et al.*

1998) et des SMC (de Nigris *et al.* 2000). De plus, il a été rapporté que les HDL peuvent transférer cette vitamine aux cellules par l'intermédiaire du SR-BI (Balazs *et al.* 2004 ; Tachikawa *et al.* 2007) dont nous avons montré l'expression par les ostéoblastes (Figure 2.3). Il devient donc important de vérifier si les HDL peuvent acheminer la vitamine E aux cellules ostéoblastiques via le SR-BI et de déterminer si ce transfert permet d'empêcher les effets toxiques des LDLOx. Cette capacité potentielle d'acheminer des antioxydants aux cellules ostéoblastiques pourrait également faire en sorte d'empêcher que les ostéoblastes puissent oxyder les LDL qui entrent en contact avec ces cellules (Figure 3.7) et ainsi prévenir les effets néfastes provenant de la génération de LDLOx au niveau du tissu osseux. L'importance d'étudier la capacité des HDL à transférer de la vitamine E aux ostéoblastes provient également du fait qu'il a été rapporté que cette vitamine a des effets bénéfiques sur le métabolisme osseux. En effet, il a été démontré que l'ostéoporose est associée avec une baisse au niveau des antioxydants plasmatiques (Maggio *et al.* 2003). De plus, il a été rapporté que la prise d'antioxydants permet de réduire les risques de fractures chez l'humain (Zhang *et al.* 2006) et que la vitamine E favorise la guérison des fractures chez les rats (Turk *et al.* 2004). Un autre mécanisme par lequel les HDL pourraient protéger contre la mort induite par les LDLOx est l'activation de la voie de survie cellulaire AKT. En effet, il a été montré au niveau des cellules endothéliales que la liaison des HDL au SR-BI entraîne l'activation de cette voie de signalisation (Ozaki *et al.* 2003). De plus, Klein *et al.* (2006) ont démontré que les LDL causent la mort des ostéoblastes en inhibant l'activité d'AKT. Ainsi, il est possible que les HDL puissent renverser cet effet.

CONCLUSIONS

L'étude de l'importance du cholestérol dans le métabolisme osseux est une discipline très récente et qui s'applique d'une part à comprendre le rôle que jouent les lipoprotéines dans le maintien de l'intégrité du tissu osseux. En effet, de par leur capacité à transporter différents lipides bioactifs et vitamines nécessaires aux fonctions ostéoblastiques, les lipoprotéines sont maintenant reconnues pour être impliquées dans la régulation de la formation osseuse. Dans cette optique, nous avons tout d'abord évalué si les LDL et les HDL, deux classes abondamment retrouvées chez l'humain, peuvent avoir un rôle à jouer dans les fonctions des ostéoblastes. Tel que représenté dans le schéma de la figure 5.1, les résultats obtenus démontrent que les cellules ostéoblastiques sont en mesure de capter le cholestérol et également l'oestrogène contenu dans ces lipoprotéines natives. De plus, nous avons montré que cette prise faite à partir des lipoprotéines repose sur un processus de captation globale mais également de captation sélective. Ce dernier phénomène de prise sélective des EC et de l'oestrogène est dû à l'expression au niveau des cellules ostéoblastiques des différents récepteurs SR-B. Ainsi, l'ensemble de ces résultats indiquent que les LDL et les HDL sont impliquées dans les fonctions ostéoblastiques de par leur aptitude à acheminer du cholestérol et de l'oestrogène par l'intermédiaire des récepteurs de la famille SR-B qui sont exprimés par les cellules ostéoblastiques.

Le deuxième objectif de ce projet de doctorat était de déterminer l'implication des lipoprotéines dans le développement de l'ostéoporose qui a été associée à la présence de conditions athérogéniques. Étant donné que les lipoprotéines deviennent athérogéniques suite à une oxydation et que les LDLOx qui en résultent sont des ligands des SR-B, nous avons déterminé l'impact de ces LDLOx sur la survie des cellules ostéoblastiques. Les résultats obtenus indiquent que de faibles concentrations de LDLOx causent la prolifération des ostéoblastes.

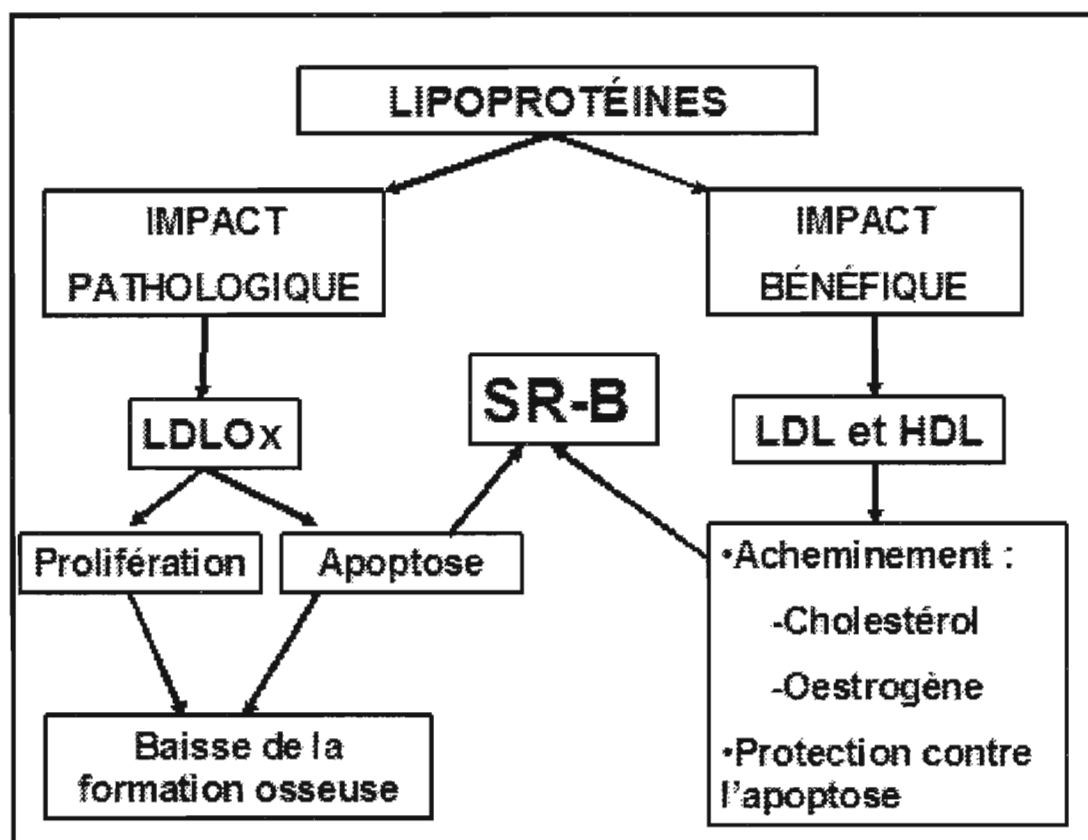


Figure 5.1 : Représentation schématique des effets pathologiques et bénéfiques des lipoprotéines. Par l'intermédiaire des LDLOx, les lipoprotéines vont induire des effets néfastes sur le métabolisme osseux, puisque les LDLOx causent la prolifération et également l'apoptose des ostéoblastes. Ces effets, antérieurement associés à une baisse de la formation osseuse, indiquent que les LDLOx peuvent entraîner le développement de l'ostéoporose. De plus, les LDLOx induisent l'apoptose par l'intermédiaire des récepteurs SR-B, ce qui indique que lors d'une condition athérogénique, ces récepteurs peuvent avoir une action néfaste sur l'os. Cependant, en condition non pathologique, les SR-B peuvent avoir un effet bénéfique sur les fonctions ostéoblastiques par leur habilité à assurer la prise de cholestérol et d'œstrogène contenu dans les LDL et les HDL. Cette dernière classe de lipoprotéines peut aussi assurer la préservation de l'intégrité du tissu osseux en empêchant la mort induite par les LDLOx. Cette action est en partie due à une modulation de l'expression des SR-B qui permet de contrer les effets néfastes des LDLOx.

Cependant, cet effet mitogénique est remplacé par la mise en place d'un processus d'apoptose des cellules ostéoblastiques lorsque la concentration des LDLOx est augmentée. Cette perte de viabilité provient du fait que les ostéoblastes sont incapables d'effectuer le métabolisme des LDLOx. Ainsi, cette incapacité ostéoblastique résulte en une accumulation lysosomale des LDLOx, ce qui entraîne subséquemment la mort des ostéoblastes par un mécanisme qui reste encore à être détaillé. Ces résultats suggèrent donc fortement que les lipoprotéines peuvent également avoir un impact pathologique, puisque la prolifération et l'apoptose induites par les LDLOx sont deux effets qui entraînent une diminution de la formation osseuse (Figure 5.1) et par conséquent le développement de l'ostéoporose. De plus, ces résultats proposent que les SR-B peuvent en condition athérogénique avoir un impact néfaste sur le métabolisme osseux, puisque des ligands des SR-B inhibent l'apoptose induite par les LDLOx. Ceci implique donc que les LDLOx entraînent la mort des ostéoblastes par l'intermédiaire des SR-B (Figure 5.1).

Enfin, nous avons montré que les HDL ont la capacité d'empêcher les effets toxiques des LDLOx et cela par l'intermédiaire d'une modulation du métabolisme de ces lipoprotéines modifiées. En effet, nous avons démontré que l'inhibition de l'apoptose des ostéoblastes induite par la présence des LDLOx provient de la capacité des HDL à empêcher l'association des LDLOx aux ostéoblastes. De plus, nous avons montré que les HDL modulent à la hausse l'expression du SR-BI. Cette augmentation du SR-BI conduit à un changement dans le métabolisme des LDLOx, puisqu'il y a une diminution de l'association protéique des LDLOx et également une hausse de la captation des EC faite à partir des LDLOx. Cette modulation donne lieu à une inhibition de la perte d'intégrité des lysosomes qui est induite par les LDLOx et ainsi à une protection contre les effets toxiques de ces lipoprotéines. Ainsi, de part leur capacité à interférer ou à moduler les mécanismes qui mènent à la prise des LDLOx, les HDL possèdent l'habileté de contrer les effets des LDLOx. Cet effet des HDL constitue également une autre indication de l'importance des lipoprotéines natives

dans les fonctions des cellules ostéoblastiques (Figure 5.1). En effet, ces résultats suggèrent l'importance de maintenir des niveaux appropriés de HDL afin d'assurer une formation osseuse adéquate. Enfin, la démonstration que la modulation de l'expression des SR-B est impliquée dans l'effet protecteur des HDL indique que sa présence est bénéfique pour le maintien des fonctions ostéoblastiques et par conséquent pour le maintien de l'intégrité osseuse (Figure 5.1).

RÉFÉRENCES

- Aarden, E.M., Burger, E.H., et Nijweide, P.J. 1994. Function of osteocytes in bone. *J. Cell Biochem.* 55 : 287-299.
- Abumrad, N.A., El-Maghrabi, M.R., Amri, E.Z., Lopez, E., et Grimaldi, P.A. 1993. Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268 : 17665-17668.
- Acton, S.L., Rigotti, A., Landschultz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., et Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271 : 518-520.
- Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., et Krieger, M. 1994. Expression cloning of SR-B1, a CD36-related class B scavenger-receptor. *J. Biol. Chem.* 269 : 21003-21009.
- Aghaloo, T.L., Amantea, C.M., Cowan, C.M., Richardson, J.A., Wu, B.M., Parhami, F., et Tetradis, S. 2007. Oxysterols enhance osteoblast differentiation in vitro and bone healing in vivo. *J. Orthop. Res.* 11 : 1488-1497.
- Akatsu, T., Murakami, T., Nishikawa, M., Ono, K., Shinomiya, N., Tsuda, E., Mochizuki, S., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Higashio, K., Yamamoto, M., Motoyoshi, K., et Nagata, N. 1998. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250 : 229-234.
- Anderson, H.C. 2003. Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* 5 : 222-226.
- Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D., et Galibert, L. 2000. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390 : 175-179.
- Anderson, R.G.W., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10 : 351-364.
- Apostolov, E.O., Basnakian, A.G., Yin, X., Ok, E., et Shah, S.V. 2006. Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 : H836-846.

Aubin, J.E., et Liu, F. 1996. The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, CA, pp 51-67.

Auge, N., Garcia, V., Maupas-Schwalm, F., Levade, T., Salvayre, R., et Negre-Salvayre, A. 2002. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 : 1990-1995.

Azhar, S., Nomoto, A., Leers-Sucheta, S., et Reaven E. 1998. Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model. *J. Lipid Res.* 39 : 1616-1628.

Babitt, J., Trigatti, B., Rigotti, A., Smart, E.J., Anderson, R.G., XU, S., et Krieger, M. 1997. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 272 : 13242-13249.

Badeau, R.M., Metso, J., Tikkanen, M.J., et Jauhiainen, M. 2007. High-density lipoprotein-associated 17beta-estradiol fatty acyl ester uptake by Fu5AH hepatoma cells: implications of the roles of scavenger receptor class B, type I and the low-density lipoprotein receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771 : 1329-1334.

Balazs, Z., Panzenboeck, U., Hammer, A., Sovic, A., Quehenberger, O., Malle, E., et Sattler, W. 2004. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J. Neurochem.* 89 : 939-950.

Barengolts, E.I., Berman, M., Kukreja, S.C., Kouznetsova, T., Lin, C., et Chomka, E.V. 1998. Osteoporosis and coronary atherosclerosis in asymptomatic postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* 62 : 209-213.

Basu, S.K., Brown, M.S., Ho, Y.K. et Goldstein, J.L. 1979. Degradation of low density lipoprotein dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* 254 : 7141-7146.

Baud, C.A. 1968. Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 56 : 227-236.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., et Freeman, B.A. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 : 1620-1624.

Bilezikian, J.P., Morishima, A., Bell, J., et Grumbach, M.M. 1998. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 339 : 599-603.

Biwa, T., Hakamata, H., Sakai, M., Miyazaki, A., Suzuki, H., Kodama, T., Shichiri, M., et Horiuchi, S. 1998. Induction of murine macrophage growth by oxidized low density lipoprotein is mediated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 273 : 28305-28313.

Bord, S., VEDI, S., Beavan, S.R., Horner, A., et Compston, J.E. 2000. Megakaryocyte population in human bone marrow increases with estrogen treatment: a role in bone remodeling? *Bone* 27 : 397-401.

Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Thompson, S.K., Amegadzie, B.Y., Hanning, C.R., Jones, C., Kurdyla, J.T., McNulty, D.E., Drake, F.H., Gowen, M., et Levy, M.A. 1996. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J. Biol. Chem.* 271 : 12517-12524.

Bourret, G., Brodeur, M.R., Luangrath, V., Lapointe, J., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2006. In vivo cholesteryl ester selective uptake of mildly and standardly oxidized LDL occurs by both parenchymal and nonparenchymal mouse hepatic cells but SR-BI is only responsible for standardly oxidized LDL selective uptake by nonparenchymal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 : 1160-1170.

Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jaattela, M., et Kroemer, G. 2003. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J. Exp. Med.* 197 : 1323-1334.

Brissette, L., Charest, M.C., et Falstraalt, L. 1996. Selective uptake of cholesteryl esters of low-density lipoproteins is mediated by the lipoprotein-binding site in HepG2 cells and is followed by the hydrolysis of cholesteryl esters. *Biochem. J.* 318 : 841-847.

Brissette, L., Charest, M.-C., Falstraalt, L., Lafond, J., Rhinds, D., Tremblay, C., et Truong, T.-Q. 1999. Selective uptake of cholesteryl esters from various classes of lipoproteins by HepG2 cells. *Biochem. Cell Biol.* 77 : 157-163.

- Brissette L, et Falstraalt L. 1994. Analysis of the selective uptake of the cholesteryl ester of human intermediate density lipoproteins by HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1213 : 5-13.
- Brodeur, M.R., Brissette, L., Falstraalt, L., Luangrath, L., et Moreau, R. 2008. Scavenger receptors expressed by osteoblasts are implicated in the selective uptake of cholesteryl ester and estradiol from low and high density lipoprotein. *J. Bone Miner. Res.* 23 : 326-337.
- Brodeur, M.R., Brissette, L., Falstraalt, L., Ouellet, P., et Moreau, R. 2008. Influence of oxidized LDL on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 44 : 506-517.
- Brodeur, M.R., Luangrath, V., Bourret, G., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2005. Physiological importance of SR-BI in the in vivo metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J. Lipid. Res.* 46 : 687-696.
- Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 2002. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol. Cell* 10 : 237-245.
- Brown, M.S., Dana, S.E., et Goldstein, J.L. 1974. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 249 : 789-796.
- Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 : 3330-3337.
- Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1983. Lipoprotein metabolism in the macrophage : implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 52 : 223-261.
- Brown, M.S., et Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232 : 34-47.
- Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R., Greten, H., Merkel, M., et Rinninger, F. 2005. Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 : 143-148.

- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., et Simonet, W.S. 1998. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12 : 1260-1268.
- Burger, E.H., et Klein-Nulend, J. 1999. Mechanotransduction in bone role of the lacunocanalicular network. *FASEB* 13 : S101-S112.
- Burgess, T.L., Qian, Y., Kaufman, S., Ring, B.D., Van, G., Capparelli, C., Kelley, M., Hsu, H., Boyle, W.J., Dunstan, C.R., Hu, S., et Lacey, D.L. 1999. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell Biol.* 145 : 527-538.
- Calvani, N., Silvestris, F., Ca.orio, P., et Dammacco, P. 2004. Osteoclastlike cell formation by circulating myeloma B lymphocytes: role of RANK-L. *Leuk. Lymphoma* 45 : 377-380.
- Calvo, D., Gomez-Coronado, D., Lasuncion, M.A., et Vega, M.A. 1997. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 : 2341-2349.
- Calvo, D., Gómez-Coronado, D., Suárez, Y., Lasunción, M.A., et Vega, M.A. 1998. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J. Lipid Res.* 39 : 777-788.
- Calvo, D., et Vega, M.A. 1993. Identification, primary structure and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. *J. Biol. Chem.* 268 : 18929-18935.
- Carron, J.A., Wagstaff, S.C., Gallagher, J.A., et Bowler, W.B. 2000. A CD36-binding peptide from thrombospondin-1 can stimulate resorption by osteoclasts in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 : 1124-1127.
- Castelli, W.P., Doyle, J.T., Gordon, T., Hames, C.G., Hjortland, M.C., Hulley, S.B., Kagan, A., et Zukel, W.J. 1977. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation* 55 : 67-72.
- Castino, R., Bellio, N., Nicotra, G., Follo, C., Trincheri, N.F., et Isidoro, C. 2007. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* 42 : 1305-1316.

Chai, Y.C., Binion, D.G., et Chisolm, G.M. 2000. Relationship of molecular structure to the mechanism of lysophospholipid-induced smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 : H1830-1838.

Chambers, T.J., Owens, J.M., Hattersley, G., Jat, P.S., et Noble, M.D. 1993. Generation of osteoclast-inductive and osteoclastogenic cell lines from the H-2KbtsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 : 5578-5582.

Chapman, M.J., Laplaud, P.M., Luc, G., Forgez, P., Bruckertt, S., Goulinet, S., et Lagrange, D. 1988. Further resolution of low density lipoprotein spectrum in normal human plasma : physicochemical characteristics of discrete sub-species separated by density gradient ultracentrifugation. *J. Lipid Res.* 29 : 442-458.

Chapuy, M.C., Schott, A.M., Garnero, P., Hans, D., Delmas, P.D., et Meunier, P.J. 1996. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 : 1129-1133.

Chen, X.P., Xun, K.L., Wu, Q., Zhang, T.T., Shi, J.S., et Du, G.H. 2007. Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species. *Vascul. Pharmacol.* 47 : 1-9.

Chinetti, G., Gbaguidi, F.G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J., et Staels, B. 2000. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101 : 2411-2417.

Chisolm, G.M., et Chai, Y. 2000. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 28 : 1697-1707.

Connelly, M.A., de la Llera-Moya, M., Peng, Y., Drazul-Schrader, D., Rothblat, G.H., et Williams, D.L. 2003. Separation of lipid transport functions by mutations in the extracellular domain of scavenger receptor class B, type I. *J. Biol. Chem.* 278 : 25773-25782.

Connelly, M.A., Klein, S.M., Azhar, S., Abumrad, N.A., et Williams, D.L. 1999. Comparaison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J. Biol. Chem.* 274 : 41-47.

- Cui, L.H., Shin, M.H., Chung, E.K., Lee, Y.H., Kweon, S.S., Park, K.S., et Choi, J.S. 2005. Association between bone mineral densities and serum lipid profiles of pre- and post-menopausal rural women in South Korea. *Osteoporosis Int.* 16 : 1975-1981.
- Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., et Funk, C.D. 1999. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 103 : 1597-1604.
- d'Amelio, P., Pescarmona, G.P., Gariboldi, A., et Isaia, G.C. 2001. High density lipoproteins (HDL) in women with postmenopausal osteoporosis: a preliminary study. *Menopause* 8 : 429-432.
- Damirin, A., Tomura, H., Komachi, M., Liu, J.P., Mogi, C., Tobo, M., Wang, J.Q., Kimura, T., Kuwabara, A., Yamazaki, Y., Ohta, H., Im, D.S., Sato, K., et Okajima, F. 2007. Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 : H2513-2522.
- Dang, Z.C., van Bezooijen, R.L., Karperien, M., Papapoulos, S.E., et Löwik, C.W. 2002. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 17 : 394-405.
- de Nigris, F., Franconi, F., Maida, I., Palumbo, G., Anania, V., et Napoli, C. 2000. Modulation by alpha- and gamma-tocopherol and oxidized low-density lipoprotein of apoptotic signaling in human coronary smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 59 : 1477-1487.
- Dennison, E.M., Syddall, H.E., Aihie-Sayer, A., Martin, H.J., et Cooper, C. 2007. Lipid profile, obesity and bone mineral density: the Hertfordshire Cohort Study. *Q.J.M.* 100 : 297-303.
- de Villiers, W.J., Cai, L., Webb, N.R., de Beer, M.C., van der Westhuyzen, D.R., et de Beer, F.C. 2001. CD36 does not play a direct role in HDL or LDL metabolism. *J. Lipid Res.* 42 : 1231-1238.
- de Villiers, W.J.S. et Smart, E.J. 1999. Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.* 66 : 740-746.
- de Vries, F., Bracke, M., Leufkens, H.G., Lammers, J.W., Cooper, C., et van Staa, T.P. 2007. Fracture risk with intermittent high-dose oral glucocorticoid therapy. *Arthritis Rheum.* 56 : 208-214.

Dietschy, J.M., Turley, S.D., et Spady, D.K. 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different species, including humans. *J. Lipid Res.* 34 : 1637-1659.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., et Zeiher, A.M. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399 : 601-605.

Dubrac, S., Parquet, M., Gripois, D., Blouquit, M.F., Serougne, C., Loison, C., et Lutton, C. 2001. Diet-dependent effects of insulin infusion on the hepatic lipoprotein receptors and the key enzymes of bile acid synthesis in the hamster. *Life Sci.* 69 : 2517-2532.

Dudley, H.R., et Spiro, D. 1961. The fine structure of bone cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11 : 627-649.

Duong, M., Collins, H.L., Jin, W., Zanotti, I., Favari, E., et Rothblat, G.H. 2006. Relative contributions of ABCA1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 : 541-547.

Edge, S.B., Hoeg, J.M., Triche, T., Schneider, P.D. et Brewer, H.B. 1986. Cultured human hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261 : 3800-3806.

Edwards, C.J., Hart, D.J., et Spector, T.D. 2000. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. *Lancet* 355 : 2218-2219.

Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., Haze, K., Itoh, A., Otsuka, M., Komatsu, R., Matsuo, T., Itabe, H., Takano, T., Tsukamoto, Y., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J., et Becker, A.E. 2001. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103 : 1955-1960.

Eisenberg, S. 1984. High density lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* 25 : 1017-1058.

Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., et Protter, A.A. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268 : 11811-11816.

Febbraio, M., Abumrad, N.A., Hajjar, D.P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S.F., et Silverstein, R.L. 1999. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 274 : 19055-19062.

Felix, R., Cecchini, M.G., et Fleisch, H. 1990. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 127 : 2592-2594.

Feng, J., Han, J., Pearce, S.F., Silverstein, R.L., Gotto, A.M., Hajjar, D.P., et Nicholson, A.C. 2000. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J. Lipid Res.* 41 : 688-696.

Fernley, H.N. 1971. Mammalian alkaline phosphatase. In the enzymes. 3rd edition. (Boyer PD, ed), pp 417-47. Academic Press, New York, London. 155-158.

Fluiter, K., Vietsch, H., Biessen, E.A., Kostner, G.M., Van Berkel, T.J. et Sattler, W. 1996. Increased selective uptake in vivo and in vitro of oxidized cholesteryl esters from high-density lipoprotein by rat liver parenchymal cells. *Biochem. J.* 319 : 471-476.

Fox, S.W., et Chow, J.W. 1998. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 23 : 1-6.

Frankenfeld, C.L., McTiernan, A., Thomas, W.K., LaCroix, K., McVarish, L., Holt, V.L., Schwartz, S.M., et Lampe, J.W. 2006. Postmenopausal bone mineral density in relation to soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Maturitas* 53 : 315-324.

Fu, T., Kozarsky, K.F., et Borensztajn, J. 2003. Overexpression of SR-BI by adenoviral vector reverses the fibrate-induced hypercholesterolemia of apolipoprotein E-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 278 : 52559-52563.

Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B., et Delmas, P.D. 2000. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J. Bone Miner. Res.* 15 : 1526-1536.

Garrett, I.R., et Mundy, G.R. 2002. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis Res.* 4 : 237-240.

Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., et Desnick, R.J. 1996. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273 : 1236-1238.

Gehron Robey, P. 2002. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of bone biology*. Vol. 1, pp. 225-237. San Diego: Academic Press.

Gerber, C.E., Bruchelt, G., Ledinski, G., Greilberger, J., Niethammer, D., et Jurgens, G. 2002. Low-density lipoprotein modification by normal, myeloperoxidase-deficient and NADPH oxidase-deficient granulocytes and the impact of redox active transition metal ions. *Redox. Rep.* 7 : 111-119.

Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D. et Quehenberger, O. 2001. Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 42 : 1474-1482.

Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1974. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 249 : 5153-5162.

Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. et Brown, M.S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 : 333-337.

Gong, M., Wilson, M., Kelly, T., Su, W., Dressman, J., Kincer, J., Matveev, S.V., Guo, L., Guerin, T., Li, X.A., Zhu, W., Uittenbogaard, A., et Smart, E.J. 2003. HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. *J. Clin. Invest.* 111:1579-1587.

Gordon, D.J., et Rifkind, B. 1998. M. High-density lipoprotein : the clinical implications of recent studies. *N. Engl. J. Med.* 321 : 1311-1316.

Gotto, A.M., Pownall, H.J., et Havel, R.J. 1986. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* 128 : 3-41.

Goudriaan, J.R., Dahlmans, V.E., Teusink, B., Ouwens, D.M., Febbraio, M., Maassen, J.A., Romijn, J.A., Havekes, L.M., et Voshol, P.J. 2003. CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J. Lipid Res.* 44 : 2270-2277.

Graf, G.A., Roswell, K.L., et Smart, E.J. 2001. 17 β -Estradiol promotes the up-regulation of SR-BII in HepG2 cells and in rat livers. *J. Lipid Res.* 42 : 1444-1449.

Graham, A.N., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'Leary, V., Darley-Usmar, V., et Moncade, S. 1989. Peroxynitrite modifications of LDL leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.* 330 : 181-186.

Green, S.R., et Pittman, R.C. 1991. Selective uptake of cholesteryl esters from low density lipoproteins in vitro and in vivo. *J. Lipid Res.* 32 : 667-678.

Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.N. et Jamieson, G.A. 1992. Membrane glycoprotein CD36 : a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80 : 1105-1115.

Greenwalt, D.E., Scheck, S.H., et Rhinehart-Jones, T. 1995. Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *J. Clin. Invest.* 96 : 1382-1388.

Gu, X., Trigatti, B., Xu, S., Acton, S., Babitt, J., et Krieger, M. 1998. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 273 : 984-995.

Guo, J., Delaney, J., et Boyle, W.J. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93 : 165-176.

Hamel, P., Abed, E., Brissette, L., et Moreau, R. 2008. Characterization of oxidized low-density lipoprotein-induced hormesis-like effects in osteoblastic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294 : C1021-1033.

Hamilton, R.L. 1972. Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. Pharmacological control of lipid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 26: 7-24.

Hammad, S.M., Barth, J.L., Knaak, C., et Argraves, W.S. 2000. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 275 : 12003-12008.

Hammad, S.M., Stefansson, S., Twal, W.O., Drake, C.J., Fleming, P., Remaley, A., Brewer, H.B., et Argraves, W.S. 1999. Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B12 complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 : 10158-10163.

Hammes, A., Andreassen, T.K., Spoelgen, R., Raila, J., Hubner, N., Schulz, H., Metzger, J., Schweigert, F.J., Lippa, P.B., Nykjaer, A., et Willnow, T.E. 2005. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 122 : 751-762.

Hammond, G.L., et Bocchinfuso, W.P. 1995. Sex hormone-binding globulin/androgen-binding protein: Steroid-binding and dimerization domains. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53 : 543-552.

Han, J., Hajjar, D.P., Tauras, J.M., Feng, J., Gotto, A.M., et Nicholson, A.C. 2000. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Biol. Chem.* 275 : 1241-1246.

Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., et Sigal, E. 2000. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 : 2100-2105.

Hardwick, S.J., Hegyi, L., et Clare, K. 1996. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J. Pathol.* 179 : 294-302.

Havel, R.J. 1984. The formation of LDL : mechanisms and regulation. *J. Lipid Res.* 25 : 1570-1576.

Havel, R.J. 1986. Functional activities of hepatic lipoprotein receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 48 : 119-134.

Havel, R.J., et Hamilton, R.L. 1988. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 8 : 1689-1704.

Heinecke, J.W., Rosen, H., et Chait, A. 1984. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.* 74 : 1890-1894.

Helisten, H.A., Höckerstedt, A., Wähälä, K., Tiitinen, A., Adlercreutz, H., Jauhiainen, M., et Tikkanen, M.J. 2001. Accumulation of high-density lipoprotein-derived estradiol-17b fatty acid esters in low-density lipoprotein particles. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86 : 1294-1300.

Hirasawa, H., Tanaka, S., Sakai, A., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Miyata, H., Moriwaki, S., Niida, S., Ito, M., et Nakamura, T. 2007. ApoE gene deficiency enhances the reduction of bone formation induced by a high-fat diet through the stimulation of p53-mediated apoptosis in osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* 22 : 1020-1030.

Höckerstedt, A., Jauhiainen, M., et Tikkanen, M.J. 2004. Lecithin/cholesterol acyltransferase induces estradiol esterification in high-density lipoprotein increasing its antioxidant potential. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 : 5088-5093.

- Hofstetter, W., Wetterwald, A., Cecchini, M.G., Mueller, C., et Felix, R. 1995. Detection of transcripts and binding sites for colony-stimulating factor-1 during bone development. *Bone* 17 : 145-151.
- Hoppe, G., O'Neil, J., et Hoff, H. 1994. Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *J. Clin. Invest.* 94 : 1506-1512.
- Hoshi, K., Ozawa, H. 2000. Matrix vesicles calcification in bones of adult rats. *Calcif. Tissue. Int.* 66 : 430-434.
- Huh, H.Y., Lo, S.K., Yesner, L.M., et Silverstein, R.L. 1995. CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270 : 6267-6271.
- Huh, H.Y., Pearce, S.F., Yesner, L.M., Schindler, J.L., Silverstein, R.L. 1996. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood* 87 : 2020-2028.
- Hundal, R.S., Salh, B.S., Schrader, J.W., Gómez-Muñoz, A., Duronio, V., et Steinbrecher, U.P. 2001. Oxidized low density lipoprotein inhibits macrophage apoptosis through activation of the PI 3-kinase/PKB pathway. *J. Lipid Res.* 42 : 1483-1491.
- Itabe, H. 2003. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified. *Biol. Pharm. Bull.* 26 : 1-9.
- Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., et Takano, T. 1994. A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. *J. Biol. Chem.* 269 : 15274-15279.
- Itabe, H., Yamamoto, H., Imanaka, T., Shimamura, K., Uchiyama, H., Kimura, J., Sanaka, T., Hata, Y., Takano, T. 1996. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J. Lipid Res.* 37 : 45-53.
- Izem, L., Rassart, E., Kamate, L., Falstraalt, L., Rhainds, D., et Brissette, L. 1998. Effect of reduced low-density lipoprotein receptor level on HepG2 cell cholesterol metabolism. *Biochem. J.* 329 : 81-89.
- Jerome, C.P. 2004. Hormonal therapies and osteoporosis. *ILAR J.* 45 : 170-178.

Jessup, W., Mander, E.L., et Dean, R.T. 1992. The intracellular storage and turnover of apolipoprotein B of oxidized LDL in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1126 : 167-177.

Jessup, W., Mohr, D., Giese, S.P., Dean, R.T., et Stocker, R. 1992. The participation of nitric oxide in cell free and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1180 : 73-80.

Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., de la Llera Moya, M., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., et Tall, A.R. 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272 : 20982-20985.

Jiang, P., Yan, P.K., Chen, J.X., Zhu, B.Y., Lei, X.Y., Yin, W.D., et Liao, D.F. 2006. High density lipoprotein 3 inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis via promoting cholesterol efflux in RAW264.7 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 27 : 151-157.

Jimi, E., Akiyama, S., Tsurukai, T., Okahashi, N., Kobayashi, K., Udagawa, N., Nishihara, T., Takahashi, N., et Suda, T. 1999. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J. Immunol.* 163 : 434-442.

Junqueira, L.C., Carneiro, J., et Kelley, R.O. 1995. Bone, basic histology. p.132-151.

Jurdic, P. 1999. Entre ostéoporose et ostéopétrose, l'ostéoclaste est un des maîtres du jeu. *Médecine/Sciences* 15 : 990-993.

Kane, J.P. 1983. Apolipoprotein B : structural and metabolic heterogeneity. *Annu. Rev. Physiol.* 45 : 637-650.

Kaplan, M., et Aviram, M. 2000. Macrophage plasma membrane chondroitin sulfate proteoglycan binds oxidized low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 149 : 5-17.

Kanehisa, J., Yamanaka, T., Doi, S., Turksen, K., Heersche, J.N., Aubin, J.E., et Takeuchi, H. 1990. A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. *Bone* 11 : 287-293.

Kataoka, H., Kume, N., et Miyamoto S. 2001. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectin-like Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 : 955-960.

Kflliker, A. 1873. Die normale Resorption des Knochengewebes und ihre Bedeutung fqr die Entstehung der typischen Kochformen, Leipzig FCW Vogel

Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., et Rothblat, G.H. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270 : 17250-17256.

Kimura, T., Sato, K., et Malchinkhuu, E. 2003. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 : 1283-1288.

Klein, B.Y., Kerem, Z., et Rojansky, N. 2006. LDL induces Saos2 osteoblasts death via Akt pathways responsive to a neutral sphingomyelinase inhibitor. *J. Cell Biochem.* 98 : 661-671.

Klein, B.Y., Rojansky, N., Ben-Yehuda, A., Abou-Atta, I., Abedat, S., et Friedman, G. 2003. Cell death in cultured human Saos2 osteoblasts exposed to low-density lipoprotein. *J. Cell Biochem.* 90 : 42-58.

Klein, R.F., Allard, J., Avnur, Z., Nikolcheva, T., Rotstein, D., Carlos, A.S., Shea, M., Waters, R.V., Belknap, J.K., Peltz, G., et Orwoll, E.S. 2004. Regulation of bone mass in mice by the lipoxigenase gene *Alox15*. *Science* 303 : 229-232.

Knecht, T.P., et Pittman, R.C. 1989. A plasma membrane pool of cholesteryl esters that may mediate the selective uptake of cholesteryl esters from high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1002 : 365-375.

Knothe Tate, M.L. 2003. Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective. *J. Biomech.* 36 : 1409-1424.

Kodama, H., Nose, M., Niida, S., et Yamasaki, A., 1991. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *J. Exp. Med.* 173 : 1291-1294.

Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., et Penninger, J.M. 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397 : 315-323.

Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Rigotti, A., Iqbal, S.N., Edelman, E.R., et Krieger, M. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-B1 alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387 : 414-417.

Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E.I., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Krahe, R., Verroust, P.J., et Moestrup, S.K. 1999. The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat. Med.* 5 : 656-661.

Krieger, M. 1998. The best of cholesterol, the worst of cholesterols : A tale of two receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 4077-4080.

Kruger, M., Claassen, N., Schlemmer, C., et Coetzer, H. 1999. Essential fatty acid supplementation: effect on oestrogen deficiency induced bone loss in the female rat. *Calcif. Tissue Int.* 64 : 63-64.

Kwiterovich, P.O. 1998. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am. J. Cardiol.* 82 : 13Q-21Q.

Lacey, D.L., Tan, H.L., Lu, J., Kaufman, S., Van, G., Qiu, W., Rattan, A., Scully, S., Fletcher, F., Juan, T., Kelley, M., Burgess, T.L., Boyle, W.J., et Polverino, A.J. 2000. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* 157 : 435-448.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Lagasse, E., et Weissman, I.L., 1997. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 89 : 1021-1031.

Lagasse, E., et Weissman, I.L., 1997. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* 89 : 1021-1031.

Lamb, D.J., et Leake, D.S. 1992. The effect of EDTA on the oxidation of low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 94 : 35-42.

Lamon-Fava, S., Sadowski, J.A., Davidson, K.W., O'Brien, M.E., Mc-Namara, J.R., et Schaefer, E.J. 1998. Plasma lipoproteins as carriers of phyloquinone (vitamin K1) in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67 : 1226-1231.

Landry, P., Sadasivan, K., Marino, A., et Albright, J. 1997. Apoptosis is coordinately regulated with osteoblast formation during bone healing. *Tissue Cell.* 29 : 413-419.

Landschulz, K., Pathak, R., Rigotti, A., Krieger, M., et Hobbs, H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98 : 984-995.

Langer, C., Gansz, B., Goepfert, C., Engel, T., Uehara, Y., Von Dehn, G., Jansen, H., Assmann, G., et von Eckardstein, A. 2002. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 296 : 1051-1057.

Langer, T., Strober, W., et Levy, R.I. 1972. The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Invest.* 51 : 1528-1536.

Laroche, M., Pouilles, J.M., Ribot, C., Bendayan, P., Bernard, J., Boccalon, H., et Mazieres, B. 1994. Comparison of the bone mineral content of the lower limbs in men with ischaemic atherosclerotic disease. *Clin. Rheumatol.* 13 : 61-64.

Lee, C.M., Chien, C.T., Chang, P.Y., Hsieh, M.Y., Jui, H.Y., Liao, C.S., Hsu, S.M., et Lee, Y.T. 2005. High density lipoprotein antagonizes oxidized low-density lipoprotein by suppressing oxygen free-radical formation and preserving nitric oxide bioactivity. *Atherosclerosis* 183 : 251-258.

Leszczynski, D.E., et Schafer, R.M. 1990. Nonspecific and metabolic interactions between steroid hormones and human plasma lipoproteins. *Lipids* 25 : 711-718.

Li, D., et Mehta, J.L. 2000. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 : 1116-1122.

Li, W., et Yuan, X.M. 2004. Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1030 : 427-433.

Li, W., Yuan, X.M., et Brunk, U.T. 1998. OxLDL-induced macrophage cytotoxicity is mediated by lysosomal rupture and modified by intralysosomal redox-active iron. *Free Radic. Res.* 29 : 389-98.

Li, W., Yuan, X.M., Olsson, A.G., et Brunk, U.T. 1998. Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 : 177-184.

- Li, Y.S., Shyy, Y.J., Wright, J.G., Valente, A.J., Cornhill, J.F., et Kolattukudy, P.E. 1993. The expression of monocyte chemotatic protein (MCP-1) in human vascular endothelium in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Biochem.* 126 : 61-68.
- Lin, S.J., Shyue, S.K., Shih, M.C., Chu, T.H., Chen, Y.H., Ku, H.H., Chen, J.W., Tam, K.B., et Chen, Y.L. 2007. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation: role of cell-cycle regulation, mitogen-activated protein kinases, and transcription factors. *Atherosclerosis* 190 : 124-1234.
- Ling, W., Lougheed, M., Suzuki, H., Buchan, A., Kodoma, T. et Steinbrecher, U.P. 1997. Oxidized or acetylated low density lipoproteins are rapidly cleared by liver in mice with disruption of the scavenger receptor class A type I/II gene. *J. Clin. Invest.* 100 : 244-252.
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., et Sargiacomo, M. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell. Biol.* 126 : 111-126.
- Liu, B., et Krieger, M. 2000. Highly purified scavenger receptor class B, type I reconstituted into phosphatidylcholine/cholesterol liposomes mediates high affinity high density lipoprotein binding and selective lipid uptake. *J. Biol. Chem.* 277 : 34125-34135.
- Liu, T., Krieger, M., Kan, H-Y., et Zannis, V.I. 2002. The effects of mutations in helices 4 and 6 of apoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. *J. Biol. Chem.* 277 : 21576-21584.
- Loison, C., Mendy, F., Serougne, C., et Lutton, C. 2002. Dietary myristic acid modifies the HDL-cholesterol concentration and liver scavenger receptor BI expression in the hamster. *Br. J. Nutr.* 87 : 199-210.
- Lormeau, C., Soudan, B., d'Herbomez, M., Pigny, P., Duquesnoy, B., et Cortet, B. 2004. Sex hormone-binding globulin, estradiol, and bone turnover markers in male osteoporosis. *Bone* 34 : 933-939.
- Lougheed, M., Moore, E.D.W., Scriven, D.R.L. et Steinbrecher, U.P. 1999. Uptake of oxidized LDL by macrophages differs from that of acetyl LDL and leads to expansion of an acidic endolysosomal compartment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 : 1881-1890.

- Lougheed, M., et Steinbrecher, U.P. 1996. Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J. Biol. Chem.* 271 : 11798-11805.
- Lougheed, M., Zhang, H., et Steinbrecher, U. 1991. Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages. *J. Biol. Chem.* 266 : 14519-14525.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., et Randall, R.J. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Luangrath, V., Brodeur, M.R., Rhainds, D., et Brissette, L. 2008. Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 : 1290-1295.
- Luegmayer, E., Glantschnig, H., Wesolowski, G.A., Gentile, M.A., Fisher, J.E., Rodan, G.A., et Reszka, A.A. 2004. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ. Suppl* 1 : S108-118.
- Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, J.D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Tempst, P., Choi, Y., et Blobel, C.P. 1999. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J. Biol. Chem.* 274 : 13613-13618.
- Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T., et Horiuchi, N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 : 874-877.
- Maeno, Y., Fujioka, H., Hollingdale, M.R., Ockenhouse, C.F., Nakasawa, S., et Aikawa, M. 1994. Ultrastructural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells, and C32 amelanotic melanoma cells. *Exp. Parasitol.* 79 : 383-430.
- Maggio, D., Barabani, M., Pierandrei, M., Polidori, M.C., Catani, M., Mecocci, P., Senin, U., Pacifici, R., et Cherubini, A. 2003. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 : 1523-1527.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., Rall(Jr), S.C., et Weisgraber, K.H. 1984. Plasma lipoproteins : apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25 : 1277-1294.

Majima, T., Shimatsu, A., Komatsu, Y., Satoh, N., Fukao, A., Ninomiya, K., Matsumura, T., et Nakao, K. 2008. Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia. *Endocr. J.* 55 : 143-151.

Manolagas, S.C., et Jilka, R.L. 1995. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 332 : 303-311.

Maor, I., et Aviram, M. 1994. Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. *J. Lipid Res.* 35 : 803-809.

Maor, I., Mandel, H., et Aviram, M. 1995. Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified cholesterol-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-ketocholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 : 1378-1387.

Mardones, P., et Rigotti, A. 2004. Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *J. Nutr. Biochem.* 15 : 252-260.

Marks, S.C., et Lane, P.W. 1976. Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *J. Hered.* 67 : 11-18.

Martens, J.S., Reiner, N.E., Herrera-Velit, P., et Steinbrecher, U.P. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized LDL. *J. Biol. Chem.* 273 : 4915-4920.

Martínez-Ramírez, M.J., Palma, S., Martínez-González, M.A., Delgado-Martínez, A.D., de la Fuente, C., et Delgado-Rodríguez, M. 2007. Dietary fat intake and the risk of osteoporotic fractures in the elderly. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61 : 1114-1120.

Masiello, L.M., Fotos, J.S., Galileo, D.S., et Karin, N.J. 2006. Lysophosphatidic acid induces chemotaxis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* 39 : 72-82.

Matsuzaki, K., Udagawa, N., Takahashi, N., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Shima, N., Morinaga, T., Toyama, Y., Yabe, Y., Higashio, K., et Suda, T. 1998. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 : 199-204.

- Matveev, S., van der Westhuyzen, D.R., et Smart, E.J. 1999. Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages. *J. Lipid Res.* 40 : 1647-1654.
- McFarlane, A.S. 1948. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* 182 : 53-54.
- McNally, A.K., Chisolm, G.M., Morel, D.W., et Cathcart, M.K. 1990. Activated human monocytes oxidize low-density lipoprotein by a lipoxygenase-dependent pathway. *J. Immunol.* 145 : 254-259.
- Meier, C.R., Schlienger, R.G., Kraenzlin, M.E., Schlegel, B., et Jick, H. 2000. Statin drugs and the risk of fracture. *JAMA* 284 : 1921-1922.
- Mendel, C.M. 1989. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr. Rev.* 10 : 232-274.
- Mertens, A., et Holvoet, P. 2001. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB. J.* 15 : 2073-2084.
- Meunier, P., Aaron, J., Edouard C., et Vignon, G. 1971. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue: a quantitative study of 84 iliac bone biopsies. *Clin. Orthop.* 80 : 147-154.
- Miller, J., et Miller, M. 1975. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet* 1 : 16-19.
- Mody, N., Parhami, F., Sarafian, T.A., et Demer L.L. 2001. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31 : 509-519.
- Morony, S., Capparelli, C., Lee, R., Shimamoto, G., Boone, T., Lacey, D.L., et Dunstan, C.R. 1999. A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF- α , PTH, PTHrP, and 1, 25(OH) $_2$ D $_3$. *J. Bone Miner. Res.* 14 : 1478-1485.
- Mulari, M.T., Zhao, H., Lakkakorpi, P.T., et Vaananen, H.K. 2003. Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* 4 : 113-125.
- Myers, D.E., Collier, F.M., Minkin, C., Wang, H., Holloway, W.R., Malakellis, M., et Nicholson, G.C. 1999. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett.* 463 : 295-300.

Nagai, M., Kyakumoto, S., et Sato, N. 2000. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 : 532-536.

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G., Chen, H., et Evans, R.M. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93 : 229-240.

Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., et Higashio, K. 1998. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 : 395-400.

Navab, M., Ananthramaiah, G.M., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., Ansell, B.J., Fonarow, G.C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J.A., Lusis, A.J., et Fogelman, A.M. 2004. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J. Lipid Res.* 45 : 993-1007.

Negre-Salvayre, A., Lopez, M., Levade, T., Pierragi, M.T., Dousset, N., Douste-Blazy, L., et Salvayre, R. 1990. Ultraviolet-treated lipoproteins as a model system for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultured cells. II. Uptake and cytotoxicity of ultraviolet-treated LDL on lymphoid cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1045 : 224-232.

Newman, P., Bonello, F., Wierzbicki, A.S., Lumb, P., Savidge, G.F., et Shearer, M.J. 2002. The uptake of lipoprotein-borne phylloquinone (vitamin K1) by osteoblasts and osteoblast-like cells: role of heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* 17 : 426-433.

Nicholson, A.C., Frieda, S., Pearce, A., et Silverstein, R.L. 1995. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 : 269-275.

Niemeier, A., Kassem, M., Toedter, K., Wendt, D., Ruether, W., Beisiegel, U., et Heeren, J. 2005. Expression of LRP1 by human osteoblasts: a mechanism for the delivery of lipoproteins and vitamin K1 to bone. *J. Bone Miner. Res.* 20 : 283-293.

Nigon, F., Lesnik, M., Rouis, M., et Chapman, M.J. 1991. Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogenous in their interactions with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* 32 : 1741-1753.

- Nishi, K., Itabe, H., Uno, M., Kitazato, K.T., Horiguchi, H., Shinno, K., et Nagahiro, S. 2002. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 : 1649-1654.
- Nofer, J.R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, A., Seedorf, U., et Assmann, G. 2001. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J. Biol. Chem.* 276 : 34480-34485.
- Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., et Kameda-Takemura, K., 1995. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J. Clin. Invest.* 96 : 1859-1865.
- O'Brien, E.A., Williams, J.H., et Marshall, M.J. 2000. Osteoprotegerin ligand regulates osteoclast adherence to the bone surface in mouse calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274 : 281-290.
- Oquendo, P.E., Hundt, E., Lawler, J., et Seed, B. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58 : 95-101.
- Out, R., Hoekstra, M., de Jager, S.C., de Vos, P., van der Westhuyzen, D.R., Webb, N.R., van Eck, M., Biessen, E.A., et van Berkel, T.J. 2005. Adenovirus-mediated hepatic overexpression of scavenger receptor class B type I accelerates chylomicron metabolism in C57BL/6J mice. *J. Lipid Res.* 46 : 1172-1181.
- Out, R., Hoekstra, M., Spijkers, J.A., Kruijt, J.K., van Eck, M., Bos, I.S., Twisk, J., et Van Berkel, T.J. 2004. Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J. Lipid Res.* 45 : 2088-2095.
- Out, R., Kruijt, J.K., Rensen, P.C., Hildebrand, R.B., de Vos, P., van Eck, M., et van Berkel, T.J. 2004. Scavenger receptor BI plays a role in facilitating chylomicron metabolism. *J. Biol. Chem.* 279 : 18401-18416.
- Oxlund, H., et Andreassen, T.T. 2000. Simvastatin given orally to adult rats increases the compressive strength of vertebral bodies. *J. Bone Min. Res.* 15 : s549.
- Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., et Stein, G.S. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol.* 143 : 420-430.

Ozaki, H., Hla, T., et Lee M.J. 2003. Sphingosine-1-phosphate signaling in endothelial activation. *J. Atheroscler. Thromb.* 10 : 125-131.

Palokangas, H., Mulari, M., et Vaananen, H.K. 1997. Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J. Cell Sci.* 110 : 1767-1780.

Pan, L.C., et Price, P.A. 1985. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K-dependent protein precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 : 6109-6113.

Parhami, F., Jackson, S.M., Tintut, Y., Le, V., Balucan, J.P., Territo, M., and Demer, L.L. 1999. Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 4 : 2067-2078.

Parhami, F., Morrow, A.D., Balucan, J., Leitinger, N., Watson, A.D., Tintut, Y., Berliner, J.A., et Demer, L.L. 1997. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation, a possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 : 680-687.

Parhami, F., Tintut, Y., Beamer, W.G., Gharavi, N., Goodman, W., et Demer, L.L. 2001. Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J. Bone Miner. Res.* 16 : 182-188.

Parthasarathy, S., Wieland, E., et Steinberg, D. 1989. A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 : 1046-1050.

Pearce, S.F., Roy, P., Nicholson, A.C., Hajjar, D.P., Febbraio, M., et Silverstein, R.L. 1998. Recombinant glutathione S-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain. *J. Biol. Chem.* 273 : 34875-34881.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., et Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 : 143-147.

Podrez, E.A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P., Cohen, P.A., Frazier, W.A., Hoff, H.F., et Hazen, S.L. 2000. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest.* 105 : 1095-1108.

- Podrez, E.A., Schmitt, D., Hoff, H.F., et Hazen, S.L. 1999. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J. Clin. Invest.* 103 : 1547-1560.
- Podrez, I., et Aviram, M. 1994. Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. *J. Lipid Res.* 35 : 803-809.
- Poli, A., Bruschi, F., Cesana, B., Rossi, M., Paoletti, R., et Crosignani, P.G. 2003. Plasma low-density lipoprotein cholesterol and bone mass densitometry in postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 102 : 922-926.
- Prele, C., M., Horton, M. A., Caterina, P., et Stenbeck, G. 2003. Identification of the molecular mechanisms contributing to polarized trafficking in osteoblasts. *Exp. Cell Res.* 282 : 24-34.
- Quinn, J.M., Elliott, J., Gillespie, M.T., et Martin, T.J. 1998. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 139 : 4424-4427.
- Rämet, M.E., Rämet, M., Lu, Q., Nickerson, M., Savolainen, M.J., Malzone, A., et Karas, R.H. 2003. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41 : 2288-2297.
- Ramseier e. Untersuchungen über arteriosklerotische Veränderungen der Knochenarterien. 1962. *Virchows Arch, Path. Anat.* 336 : 77-86.
- Rankin, S.M., Parthasarathy, S., et Steinberg, D. 1991. Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J. Lipid Res.* 32 : 449-456.
- Reaven, E., Lua, Y., Nomoto, A., Temel, R., Williams, D.L., van der Westhuyzen, D.R., et Azhar, S. 1999. The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436 : 565-576.
- Ren, Y., Silverstein, L., Allen, J., et Savill, J. 1995. CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J. Exp. Med.* 181 : 1857-1862.

Rhainds, D., Bourgeois, P., Bourret, G., Huard, K., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2004. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J. Cell Sci.* 117 : 3095-3105.

Rhainds, D., Brodeur, M., Lapointe, J., Charpentier, D., Falstraalt, L., et Brissette, L. 2003. The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry* 42 : 7527-7538.

Rhainds, D., Falstraalt, L., Tremblay, C. et Brissette, L. 1999. Uptake and fate of class B scavenger receptor ligands in HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* 261 : 227-235.

Riggs, B.L., Khosla, S., et Melton, L.J. 1998. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J. Bone Miner. Res.* 13 : 763-773

Rigotti, A., Acton, S.L., et Krieger, M. 1995. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J. Biol. Chem.* 270 : 16221-16224.

Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., et Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 : 12610-12615.

Rinninger, F., Jaeckle, S., Greten, H., et Windler, E. 1993. Selective association of lipoprotein cholesteryl esters with liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1166 : 284-299.

Rizzo, M., di Fede, G., Mansueto, P., Castello, F., Carmina, E., et Rini, G.B. 2004. Statins and osteoporosis: myth or reality? *Minerva Med.* 95 : 521-527.

Robbesyn, F., Garcia, V., Auge, N., Vieira, O., Frisach, M.F., Salvayre, R., et Negre-Salvayre, A. 2003. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J.* 17 : 743-745.

Roberts, D.C., Miller, N.E., Price, S.G., Crook, D., Cortese, C., La Ville, A., Masana, L., et Lewis, B. 1985. An alternative procedure for incorporating radiolabelled cholesteryl ester into human plasma lipoproteins in vitro. *Biochem. J.* 226 : 319-322.

Rodan, G.A., et Martin, T.J. 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289 : 1508-1514.

Rosenfeld, M.E., Palinski, W., Yla-Herttuala, S., Butler, S., et Witztum, J.L. 1990. Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis* 10 : 336-349.

Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., et von Figura, K. 1998. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 : 13453-13458.

Sahali, D., Mulliez, N., Chatelet, F., Laurent-Winter, C., Citadelle, D., Roux, C., Ronco, P., et Verroust, P. 1992. Coexpression in humans by kidney and fetal envelopes of a 280 kDa-coated pit-restricted protein. Similarity with the murine target of teratogenic antibodies. *Am. J. Pathol.* 140 : 33-44.

Saika, M., Inoue, D., Kido, S., et Matsumoto, T. 2001. Estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor. *Endocrinology* 142 : 2205-2212

Saintier, D., Khanine, V., Uzan, B., Ea, H.K., de Vernejoul, M.C., et Cohen-Solal, M.E. 2006. Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 99 : 165-173.

Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H., et Negre-Salvayre, A. 2002. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585 : 213-221.

Samuels, A., Perry, M.J., et Tobias, J.H. 1999. High-dose estrogen induces de novo medullary bone formation in female mice. *J. Bone Miner. Res.* 14 : 178-186.

Sato, T., Morita, I., et Murota, S. 1998. Involvement of cholesterol in osteoclast-like cell formation via cellular fusion. *Bone* 23 : 135-140.

Scanu, A.M., et Landsberger, F.R. 1980. Lipoprotein structure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 348 : 1-436.

Scatchard, G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 : 660-672.

Schilling, A.F., Schinke, T., Münch, C., Gebauer, M., Niemeier, A., Priemel, M., Streichert, T., Rueger, J.M., et Amling, M. 2004. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E. *J. Bone Miner. Res.* 20 : 274-282.

Schmidt, A., Geigenmüller, S., Völker, W., et Buddecke, E. 2006. The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt \rightarrow NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic. Res. Cardiol.* 101 : 109-116.

Schneider, W.J., Beisiegel, U., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 1982. Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J. Biol. Chem.* 269 : 2664-2673.

Schoofs, M.W., Sturkenboom, M.C., van der Klift, M., Hofman, A., Pols, H.A., et Stricker, B.H. 2004. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of vertebral fracture. *J. Bone Miner. Res.* 19 : 1525-1530.

Schoppet, M., Preissner, K.T., et Hofbauer, L.C. 2002. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 : 549-553.

Seetharam, B., Christensen, E.I., Moestrup, S.K., Hammond, T.G., et Verroust, P.J. 1997. Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J. Clin. Invest.* 99 : 2317-2322.

Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A.K., Gibson, L.L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K.L., Hahner, L.D., Cummings, M.L., Kitchens, R.L., Marcel, Y.L., Rader, D.J., et Shaul, P.W. 2005. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ. Res.* 98 : 63-72.

Segrest, J.P., Jackson, R.L., Morrisett, J.D., et Gotto(Jr), A.M. 1974. A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *FEBS Lett.* 38 : 247-258.

Sfeir, Z., Ibrahimi, A., Amri, E., Grimaldi, P., et Abumrad, N. 1997. Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57 : 17-21.

Shearer, M.J. 1997. The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc. Nutr. Soc.* 56 : 915-937.

Shearer, M.J. 2000. Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3 : 433-438.

Shiraki, M., Shiraki, Y., Aoki, C., Hosoi, T., Inoue, S., Kaneki, M., et Ouchi, Y. 1997. Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 12 : 1438-1445.

Shwaery, G.T., Vita, J.A., et Keaney, J.F. 1997. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 β -estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation* 95 : 1378-1385.

Shwaery, G.T., Vita, J.A., et Keaney, J.F. 1998. Antioxidant protection of LDL by physiologic concentrations of estrogens is specific for 17- β -estradiol. *Atherosclerosis* 138 : 255-262.

Sigurdsson, G., Nicoll, A., et Lewis, B. 1975. Conversion of very low density lipoprotein to low density. A metabolic study of apolipoprotein B kinetics in human subjects. *J. Clin. Invest.* 56 : 1481-1490.

Silver, D.L., Wang, N., Xiao, X., et Tall, A.R. 2001. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class b typeI results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J. Biol. Chem.* 276 : 25287-25293.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., et Boyle, W.J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 : 309-319.

Smith, B.J., Lucas, E.A., Turner, R.T., Evans, G.L., Lerner, M.R., Brackett, D.J., Stoecker, B.J., et Arjmandi, B.H. 2004. Vitamin E provides protection for bone in mature hindlimb unloaded male rats. *Calcif. Tissue Int.* 76 : 272-279.

Solomon, D.H., Avorn, J., Canning, C.F., et Wang, P.S. 2005. Lipid levels and bone mineral density. *Am. J. Med.* 118 : 1414.

Souto, R.P., Vallega, G., Wharton, J., Vinten, J., Tranum-Jensen, J., et Pilch, P.F. 2003. Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 278 : 18321-18329.

Sozuer, D.T., Atakil, D., Dogu, O., Baybas, S., et Arpaci, B. 1997. Serum lipids in epileptic children treated with carbamazepine and valproate. *Eur. J. Pediatr.* 156 : 565-567.

Spady, D.K., Kearney, D.M., et Hobbs, H.H. 1999. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 (SR-BI) expression and HDL cholesteryl ester uptake in the hamster. *J. Lipid. Res.* 40 : 1384-1394.

Spelsberg, T.C., Subramaniam, M., Riggs, B.L., et Khosla, S. 1999. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol.* 13 : 819-828.

Sprague, S.M. 2007. Renal function and risk of hip and vertebral fractures in older women: is it always osteoporosis? *Arch. Intern. Med.* 167 : 115-116.

Staal, A., Frith, J.C., French, M.H., Swartz, J., Gungor, T., Harrity, T.W., Tamasi, J., Rogers, M.J., et Feyen, J.H. 2003. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J. Bone Miner. Res.* 18 : 88-96.

Stangl, H., Cao, G., Wyne, K.L., et Hobbs, H.H. 1998. Scavenger receptor, class B, type I-dependant stimulation of cholesterol esterification by high density lipoproteins, low density lipoproteins, and nonlipoprotein cholesterol. *J. Biol. Chem.* 273 : 31002-31008.

Stein, G.S., Lian, J.B., et Owen, T.A. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* 4 : 3111-3123.

Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272 : 20963-20966.

Steinbrecher, U. P. 1987. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J. Biol. Chem.* 262 : 3603-3608.

Stenflo, J., Ferlund, P., Egan, W., et Roepstorff, P. 1974. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71 : 2730-2733.

Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R., et Negre-Salvayre, A. 1997. HDL and apoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 : 2158-2166.

Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K., Abe, K., Asami, S., et Oikawa, S. 2000. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271 : 688-692.

Sun, B., Boyanovsky, B.B., Connelly, M.A., Shridas, P., van der Westhuyzen, D.R., et Webb, N.R. 2007. Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J. Lipid Res.* 48 : 2560-2570.

Sun, D., Krishnan, A., Zaman, K., Lawrence, R., Bhattacharya, A., et Fernandes, G. 2003. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Res.* 18 : 1206-1216.

Swarnakar, S., Temel, R.E., Connely, M.A., Azhar, S., et Williams, D.L. 1999. Scavenger receptor class B, type I, mediates selective uptake of low density lipoprotein cholesteryl ester. *J. Biol. Chem.* 274 : 29733-29739.

Tachikawa, M., Okayasu, S., et Hosoya, K. 2007. Functional involvement of scavenger receptor class B, type I, in the uptake of alpha-tocopherol using cultured rat retinal capillary endothelial cells. *Mol. Vis.* 13 : 2041-2047.

Takahashi, N., Akatsu, T., Udagawa, N., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Moseley, J.M., Martin, T.J., et Suda, T. 1988. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123 : 2600-2602.

Tall, M.A., Rao, P.E., Westberg, E., Allegar, N., Makowski, M., Mittler, R.S., et Goldstein, G. 1983. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* 78 : 83-89.

Tang, M., Abplanalp, W., et Subbiah, M.T. 1997. Association of estrogens with human plasma lipoproteins: Studies using estradiol- 17b and its hydrophobic derivative. *J. Lab. Clin. Med.* 129 : 447-452.

Tintut, Y., Morony, S., et Demer, L.L. 2004. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 : E6-E10.

Tobias, J.H., et Compston, J.E. 1999. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? *Bone* 24 : 121-124.

Tondravi, M.M., McKercher, S.R., Anderson, K., Erdmann, J.M., Quiroz, M., Maki, R., et Teitelbaum, S.L. 1997. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* 386 : 81-84.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., et Evans, R.M. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93 : 241- 252.

Tortora, G.J., Grabowski, S.R. et Parent, J.C. 1993. Principes d'anatomie et de physiologie. Biological Sciences Textbooks. 154-173.

Truong, T.Q., Auger, A., Denizeau, F., et Brissette, L. 2000. Analysis of low-density lipoprotein catabolism by primary cultures of hepatic cells from normal and low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1484 : 307-315.

Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., et Higashio, K. 1997. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 : 137-142.

Turk, C., Halici, M., Guney, A., Akgun, H., Sahin, V., et Muhtaroglu, S. 2004. Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J. Int. Med. Res.* 32 : 507-512.

Udagawa, N., Takahashi, N., Akatsu, T., Sasaki, T., Yamaguchi, A., Kodama, H., Martin, T.J., et Suda, T. 1989. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology* 125 : 1805-1813.

Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M.T., Martin, T.J., Higashio, K., et Suda T. 2000. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 141 : 3478-3484.

Ueda, Y., Royer, L., Gong, E., Zhang, J., Cooper, P.N., Francone, O., et Rubin, E.M. 1999. Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 274 : 7165-7171.

Uyama, O., Yoshimoto, Y., Yamamoto, Y., et Kawai, A. 1997. Bone changes and carotid atherosclerosis in postmenopausal women. *Stroke* 28 : 1730-1732.

Vaananen, H.K., et Horton, M. 1995. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* 108 : 2729-2732.

Vance, D.E., et Vance, J.E. *Éditeurs*. 1993. Biochemistry of lipids and membranes. The Benjamin Cummings Publishing Co, Don Mills, Ontario.

Varban, M.L., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Gosselin, M.L., Dixon, K.L., Deeds, J.D., Acton, S.L., Tall, A.R., et Huszar, D. 1998. Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 : 4619-4624.

Vieira, O., Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Basile, J.P., Laranjinha, J., Almeida, L., Salvayre, R., et Negre-Salvayre, A. 1998. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br. J. Pharmacol.* 123 : 565-573.

Vistisen, B., Roepstorff, K., Roepstorff, C., Bonen, A., van Deurs, B., et Kiens, B. 2004. Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin-3 and is more abundant in type 1 than in type 2 fibers. *J. Lipid Res.* 45 : 603-609.

von Eckardstein, A., Hersberger, M., et Rohrer, L. 2005. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 8 : 147-52.

Votta, B.J., Levy, M.A., Badger, A., Bradbeer, J., Dodds, R.A., James, I.E., Thompson, S., Bossard, M.J., Carr, T., Connor, J.R., Tomaszek, T.A., Szewczuk, L., Drake, F.H., Veber, D.F., et Gowen, M. 1997. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 12 : 1396-1406.

Wang, N., Arai, T., Ji, Y., Rinninger, F., et Tall, A.R. 1998. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein apoB, low density lipoprotein apoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 273 : 32920-32926.

Webb, N.R., Connell, P.M., Graf, G.A., Smart, E.J., de Villiers, W.J., de Beer, F.C., et van der Westhuyzen, D.R. 1998. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J. Biol. Chem.* 273 : 15241-15248.

Webb, N.R., de Beer, M.C., Yu, J., Kindy, M.S., Daugherty, A., van der Westhuyzen, D.R., et de Beer, F.C. 2002. Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res.* 43 : 1421-1428.

Webb, N.R., de Villiers, W.J., Connell, P.M., de Beer, F.C., et van der Westhuyzen, D.R. 1997. Alternative forms of the scavenger receptor BI (SR-BI). *J. Lipid Res.* 38 : 1490-1495.

Wilkie, D., Bowman, B., Lyga, A., Bagi, C.M., Miller, S.C., Ranges, G.E., et Carley, W. 2000. Cerivastatin increases cortical bone formation in OVX rats. *J. Bone Min. Res.* 15 : s549.

- Windler, E., Chao, Y.S., et Havel, R.J. 1980. Determinants of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants in the rat. *J. Biol. Chem.* 255 : 5475-5480.
- Windler, E., Chao, Y.S., et Havel, R.J. 1980. Regulation of hepatic uptake of triglyceride-rich lipoproteins in the rat. *J. Biol. Chem.* 255 : 8303-8307.
- Windler, E., Kovanen, P.T., et Chao, Y.S. 1980. The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver : a binding site that mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J. Biol. Chem.* 255 : 10464-10471.
- Windmueller, H.G., Herbert, P.N., et Levy, R.I. 1973. Biosynthesis of lymph and plasma lipoprotein apoproteins by isolated perfused rat liver and intestine. *J. Lipid Res.* 14 : 215-223.
- Wintergerst, E.S., Jelk, J., Rahner, C., et Asmis, R. 2000. Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur. J. Biochem.* 267 : 6050-6059.
- Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V.I., et Krieger, M. 1997. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J. Lipid Res.* 38 : 1289-1298.
- Yamaguchi, T., Sugimoto, T., Yano, S., Yamauchi, M., Sowa, H., Chen, Q., et Chihara, K. 2002. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr. J.* 49 : 211-217.
- Yamamoto, S. 1992 Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1128 : 117-122.
- Yamane, T., Kunisada, T., Yamazaki, H., Era, T., Nakano, T., et Hayashi, S.I. 1997. Development of osteoclasts from embryonic stem cells through a pathway that is c-fms but not c-kit dependent. *Blood* 90 : 3516-3523.
- Yancey, P.G., et Jerome, W.G. 2001. Lysosomal cholesterol derived from mildly oxidized low density lipoprotein is resistant to efflux. *J. Lipid Res.* 42 : 317-327.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., et Brown, M.S. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110 : 489-500.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N., et Suda, T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 : 3597-3602.

Yates, M.T., Lambert, L.E., Whitten, J.P., MacDonald, I., Mano, M., Ku, G., et Mao, S.J.T. 1992 A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoprotein by mouse macrophages. *FEBS Lett.* 309 : 135-140.

Yesner, L.M., Huh, H.Y., Pearce, S.F., et Silverstein, R.L. 1996. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 : 1019-1025.

Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L., et Steinberg, D. 1989. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 84 : 1086-1095.

Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., et Shultz, L.D. 1990. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345 : 442-444.

Young, I.S., et McEneny, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29 : 358-362.

Young, I.S., et McEneny, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 29 : 358-362.

Yuan, X.M., Li, W., Olsson, A.G., et Brunk, U.T. 1997. The toxicity to macrophages of oxidized low-density lipoprotein is mediated through lysosomal damage. *Atherosclerosis* 133 : 153-161.

Yvan-Charvet, L., Bobard, A., Bossard, P., Massiera, F., Rousset, X., Ailhaud, G., Teboul, M., Ferre, P., Dagher, G., et Quignard-Boulange, A. 2007. In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 : 1340-1345.

Zeng, Y., Tao, N., Chung, K.N., Heuser, J.E., et Lublin, D.M. 2003. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 278 : 45931-45936.

Zhang, J., Munger, R.G., West, N.A., Cutler, D.R., Wengreen, H.J., et Corcoran, C.D. 2006. Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: an effect modified by smoking status. *Am. J. Epidemiol.* 163 : 9-17.

ANNEXE I

Focus on the estradiol fatty acid esters: A Comment on Brodeur *et al.* (2008): Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL₃

Maija H. Badeau, Robert Badeau*, Matti Jauhiainen*, and Matti J. Tikkanen

Department of Medicine, Helsinki University and *Department of Molecular Medicine, National Public Health Institute

The recent paper by Brodeur et al. on the metabolism of low (LDL) and high density lipoproteins (HDL) by osteoblastic cells showed for the first time that these cells express scavenger receptors of class B (SR-B)⁽¹⁾. This important study presents a novel mechanism, which explains how cholesterol and estradiol carried by LDL and HDL₃ can enter the osteoblast. The authors refer to the previously reported correlation between atherosclerosis and the development of osteoporosis, as well as the well defined importance of estrogen in bone metabolism. The results of their study suggest that lipoproteins have a significant role in the routing of cholesterol and estradiol to bone cells, to be taken up selectively by a SR-B mediated process. Interestingly, Gong et al. showed SR-B type I dependent uptake of HDL-associated estradiol into vascular endothelial cells, which implies the possibility of a similar mechanism in these cell types⁽²⁾. According to our newly published data, HDL-associated, esterified estradiol is also taken up by liver-derived cells by both SR-B type I and LDL receptors (LDLr), and becomes hydrolyzed in the cells to free estradiol⁽³⁾.

As Brodeur et al. mention in their paper, estradiol is known to associate with LDL and HDL in fatty acid ester form, a mechanism shared with also other steroid hormones^(4,5). Steroid fatty acid esters are water-insoluble molecules, which are transported in lipoprotein particles in the circulation. Unesterified steroids are

incorporated in lipoproteins only to a small extent. Brodeur et al. do not discuss the possibility that the lipoprotein bound estradiol in their study could be, in fact, esterified with fatty acids. The fatty acid esterification of estradiol would be important to specify, because the esterification has been shown to enhance the potential of estradiol to protect lipoproteins from oxidation^(6,7,8). The antioxidant protection of LDL by bound estradiol esters even after entering the arterial intima could hinder the progress of atherosclerosis, and similar mechanism could have a role also in bone health, assuming that oxidized LDL participates in the pathogenesis of osteoporosis. It is known that estradiol becomes esterified in plasma on HDL₃ particles by lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT), and is transferred from HDL to LDL in a process at least partly mediated by cholesteryl ester transfer protein (CETP)^(9, 10). In our *in vitro* incubations with plasma and also isolated total plasma HDL and HDL₃ subfraction, under conditions similar to the ones used by Brodeur et al., estradiol associates with lipoprotein particles in mostly esterified form^(3,9). In HDL particles after plasma incubation, 83% of bound hormone was fatty acid ester and only 17% free, unesterified E₂. In isolated HDL and HDL₃ subfraction, without any purification, there is still enough lipoprotein associated LCAT left to support the fatty acid esterification of estradiol⁽⁹⁾. In serum samples from pregnant women, estradiol accumulates in lipoproteins in esterified form and free estradiol is mostly undetectable by time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) in isolated VLDL, LDL and HDL fractions⁽¹¹⁾. We have also quantitated estradiol fatty acid esters in blood and adipose tissue samples from postmenopausal women, as well as premenopausal and pregnant women^(12,13). The results confirm the abundance of these lipophilic estrogen derivatives in adipose tissue and show that the proportion of esterified estradiol compared to free hormone is enhanced during low estrogen status. The serum estradiol ester/free ratio was lowest in pregnancy (0.5%), and increased to 15% in premenopausal women and to 110% in postmenopausal women. In postmenopausal women the overwhelming majority of estradiol was present in adipose tissue, most of it in fatty acid ester form⁽¹³⁾.

The estradiol fatty acid esterification and hydrolysis have been described in humans and various tissues from mammals and invertebrates, showing that these mechanisms are evolutionally conserved and probably of importance^(4,14). Although the function of estradiol esters has not been clarified, they are known to have long half-lives and to display prolonged hormonal activity, which suggests a function as a reservoir for the release of active estradiol, probably by hormone sensitive lipase (HSL) present in the cytosol⁽¹⁵⁻¹⁹⁾. The release of estradiol from its fatty acid ester form would also be a faster way to obtain active hormone compared to biosynthesis from cholesterol. The recently published results imply that the fatty acid esterification of estradiol and subsequent transportation of these esters in plasma lipoprotein particles may have an important role in the selective routing of the active hormone to target tissues, such as bone, vascular endothelium or liver cells. It is intriguing to note that also other steroid hormones, such as dehydroepiandrosterone (DHEA), pregnenolone and $\Delta 5$ -androstenediol are esterified by LCAT, after which they become associated with HDL and are taken up by animal cells resulting in hydrolysis of the esters and subsequent metabolic conversion of the hormones^(4,20,21). With pregnenolone, there is also evidence of lipoprotein receptor -mediated uptake mechanism. Future studies must be designed to increase our understanding of the lipoprotein associated steroid hormone esters and their uptake into tissues as well as to put this knowledge into use in designing therapies targeted to postmenopausal osteoporosis and atherosclerosis in particular.

RÉFÉRENCE

1. Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Luangrath V, Moreau R 2007 Scavenger receptor of class B expressed by osteoblastic cells are implicated in the uptake of cholesteryl ester and estradiol from LDL and HDL₃. *J Bone Miner Res* (epub ahead of print).
2. Gong M, Wilson M, Kelly T, Su W, Dressman J, Kincer J, Matveev SV, Guo L, Guerin T, Li X-A, Zhu W, Uittenbogaard A, Smart EJ 2003 HDL-associated estradiol stimulates endothelial NO synthase and vasodilation in an SR-BI-dependent manner. *J Clin Invest* **111**:1579-1587.

3. Badeau RM, Metso J, Tikkanen MJ, Jauhiainen M 2007 High-density lipoprotein-associated 17 β -estradiol fatty acyl ester uptake by Fu5AH hepatoma cells: Implications of the roles of scavenger receptor class B, type I and the low-density lipoprotein receptor. *Biochim Biophys Acta* **1771**:1329-1334.
4. Hochberg RB 1998 Biological esterification of steroids. *Endocr Rev* **19**:331-348.
5. Tikkanen MJ, Vihma V, Jauhiainen M, Höckerstedt A, Helisten H, Kaamanen M 2002 Lipoprotein-associated estrogens. *Cardiovasc Res* **56**:184-188.
6. Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF 1997 Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 β -estradiol. *Circulation* **95**:1378-1385.
7. Höckerstedt A, Jauhiainen M, Tikkanen MJ 2004 Lecithin/cholesterol acyltransferase induces estradiol esterification in high-density lipoprotein, increasing its antioxidant potential. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:5088-5093.
8. Meng, QH, Höckerstedt A, Heinonen S, Wähälä K, Adlercreutz H, Tikkanen MJ 1999 Antioxidant protection of lipoproteins containing estrogens: *in vitro* evidence for low- and high-density lipoproteins as estrogen carriers. *Biochim Biophys Acta* **1439**:331-340.
9. Höckerstedt A, Tikkanen MJ, Jauhiainen M 2002 LCAT facilitates transacylation of 17 β -estradiol in the presence of HDL₃ subfraction. *J Lipid Res* **43**:392-397.
10. Helisten H, Höckerstedt A, Wähälä K, Tiitinen A, Adlercreutz H, Jauhiainen M, Tikkanen MJ 2001 Accumulation of high-density lipoprotein-derived estradiol-17 β fatty acid esters in low-density lipoprotein particles. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1294-1300.
11. Vihma V, Tiitinen A, Ylikorkala O, Tikkanen MJ 2003 Quantitative determination of estradiol fatty acid esters in lipoprotein fractions in human blood. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:2552-2555.
12. Vihma V, Adlercreutz H, Tiitinen A, Kiuru P, Wähälä K, Tikkanen MJ 2001 Quantitative determination of estradiol fatty acid esters in human pregnancy serum and ovarian follicular fluid. *Clin Chem* **47**:1256-1262.
13. Badeau M, Vihma V, Mikkola TS, Tiitinen A, Tikkanen MJ 2007 Estradiol fatty acid esters in adipose tissue and serum of pregnant and pre- and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:4327-4331.
14. Sternberg, RM, LeBlanc GA 2006 Kinetic characterization of the inhibition of acyl coenzyme A: steroid acyltransferases by tributyltin in the eastern mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Aquat Toxicol* **78**:233-242.
15. Lerner JM, Hochberg RB 1985 The clearance and metabolism of estradiol and estradiol-17-esters in the rat. *Endocrinology* **117**:1209-1214.

16. Larner JM, MacLusky NJ, Hochberg RB 1985 The naturally occurring C-17 fatty acid esters of estradiol are long-acting estrogens. *J Steroid Biochem* **22**:407-413.
17. Hershcopf RJ, Bradlow HL, Fishman J, Swaneck GE, Larner JM, Hochberg RB 1985 Metabolism of estradiol fatty acid esters in man. *J Clin Endocrinol Metab* **61**:1071-1075.
18. Lee FT, Adams JB, Garton AJ, Yeaman SJ 1988 Hormone-sensitive lipase is involved in the hydrolysis of lipoidal derivatives of estrogens and other steroid hormones. *Biochim Biophys Acta* **963**:258-264.
19. Vázquez-Alcántara MA, Menjivar M, Garcia GA, Díaz-Zagoya JC, Garza-Flores J 1989 Long-acting estrogenic responses of estradiol fatty acid esters. *J Steroid Biochem* **33**:1111-1118.
20. Roy R, Bélanger A 1992 Elevated levels of endogenous pregnenolone fatty acid esters in follicular fluid high density lipoproteins support progesterone synthesis in porcine granulosa cells. *Endocrinology* **131**:1390-1396.
21. Roy R, Bélanger A 1993 ZR-75-1 breast cancer cells generate non-conjugated steroids from low density lipoprotein-incorporated lipoidal dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* **133**:683-689.

ANNEXE II

A matter of degree: A commentary on “Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells”.

Linda L. Demer^a and Yin Tintut^a

^aDepartment of Medicine, Physiology and Biomedical Engineering, David Geffen School of Medicine, University of California at Los Angeles, BH-307 CHS, 10833 LeConte Avenue, Los Angeles, CA 90095-1679, USA

While the bioactivity of oxidized lipids is acknowledged in the context of the vasculature and smooth muscle cells, less is known about their effects on bone and osteoblastic cells. This may be due in part to the general impression that osteoblasts would have less exposure to oxidized lipids than smooth muscle cells, since smooth muscle cells are only one endothelial layer (and a basement membrane) away from the blood and its lipoproteins. Lipoprotein particles which are, technically, nanoparticles ordinarily cross the endothelial barrier to varying degrees, depending on their concentration and the integrity of the endothelial layer. Some may pass through the smooth muscle layer to the adventitial lymphatic drainage, and some may be cleared by monocyte macrophages of the reticulo-endothelial system, but, when clearance systems are overwhelmed, the particles are retained in the subendothelial matrix, where, given enough time, they undergo nonenzymatic oxidation, presumably by reactive oxygen species produced by metabolic activity of nearby cells.

It may seem unlikely that cells deep in skeletal bone would encounter lipoproteins or oxidized lipoproteins. Bone is not generally considered a vascular organ, but it bleeds when cut, and osteoblasts have essentially the same anatomic proximity to the blood and lipoproteins as do vascular smooth muscle cells. In cortical bone, they are located circumferentially around the subendothelial matrix of Haversian canal vessels, and, in

trabecular bone, they are adjacent to the subendothelial matrix of marrow sinusoidal vessels. The subendothelial matrix in bone should be no less vulnerable to lipid deposition than the matrix of other vessels. Indeed, there is histological evidence for lipids in the perivascular spaces of human cortical bone, and mass spectrophotometric evidence for oxidized lipids in murine bone marrow, which is also rich in subendothelial osteoblastic cells [1]. In this issue, Brodeur and colleagues provide evidence that local accumulation of products of lipid oxidation in bone may be due to the capacity of osteoblasts to oxidize lipoprotein particles [2]. Such a finding would indicate that a process similar to atherogenic inflammation may be occurring in bone tissue.

EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE :

Osteoporosis is positively associated with hyperlipidemia. Bone density is diminished by diet-induced hyperlipidemia in both wild-type [3] and in ultrahyperlipidemic apoE null mice [4], while bone formation rate is reduced in dogs fed a diet high in oxidized fat [5], and enhanced in chickens receiving antioxidants [6]. These findings are also consistent with clinical reports that lipid-lowering agents reduce fracture risk, though this finding has not been confirmed in randomized trials. Thus, it appears that lipoprotein particles may impair osteogenesis and explain apparent adverse effects of hyperlipidemia on bone.

The association between hyperlipidemia and osteoporosis may result from a direct effect of hyperlipidemia on bone metabolism. Preosteoblasts from mice with diet-induced hyperlipidemia have a reduced capacity for in vitro differentiation and mineralization compared with cells from chow-fed mice [7]. This possibility is supported by the finding that oxidant stress, in general [8] and [9], and mildly oxidized lipoprotein, in particular, inhibit differentiation in osteoblastic and marrow preosteoblastic cells [10]. It is also supported by the finding that lipoproteins induce a signaling pathway for osteoblastic cell death in vitro [11]. In this issue, Brodeur and

colleagues provide evidence for an additional mechanism by which oxidized lipoprotein particles may create conditions conducive to osteoporosis. They found that oxidized lipoprotein particles reduce the number of mature osteoblasts in two ways: by promoting proliferation, which inhibits maturation [12], and by decreasing osteoblast viability.

MECHANISMS :

In their report in this issue, Brodeur and colleagues [2] now clarify both the effects of oxidized lipids on osteoblasts and the effects of osteoblasts on lipid oxidation. From these findings, a working model emerges. In hyperlipidemia, LDL particles may accumulate in the subendothelial matrix surrounding skeletal blood vessels and sinusoids, where they are oxidized and internalized by adjacent osteoblasts. Depending on the concentration of these oxidized particles, the affected osteoblasts would undergo apoptosis or simply fail to mineralize, ultimately resulting in loss of bone density.

IMPLICATIONS :

Thus, if the lipoprotein clearance systems are overwhelmed or residence time increased due to hyperlipidemia, abnormal matrix adhesiveness, or possibly loss of lymphatic drainage due to immobility, oxidized lipids may form in both bone and arteries and contribute to both atherosclerosis and osteoporosis, potentially accounting for their epidemiological association. Thus, it may become important to address hyperlipidemia, as well as diet and physical activity, as part of treatment programs for osteoporosis as well as for atherosclerosis.

REFERENCES

- [1]Y. Tintut, S. Morony and L.L. Demer, Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24** (2004), pp. e6–e10.
- [2]M.R. Brodeur, L. Brisette, L. Falstraalt, P. Ouellet and R. Moreau, Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells., *Free Radic. Biol. Med.* **44** (2008), pp. 506–517.
- [3]F. Parhami, Y. Tintut, W.G. Beamer, N. Gharavi, W. Goodman and L.L. Demer, Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice, *J. Bone Miner. Res.* **16** (2001), pp. 182–188.
- [4]H. Hirasawa, S. Tanaka, A. Sakai, M. Tsutsui, H. Shimokawa, H. Miyata, S. Moriwaki, S. Niida, M. Ito and T. Nakamura, ApoE gene deficiency enhances the reduction of bone formation induced by a high-fat diet through the stimulation of p53-mediated apoptosis in osteoblastic cells, *J. Bone Miner. Res.* **22** (2007), pp. 1020–1030.
- [5]J.J. Turek, B.A. Watkins, I.A. Schoenlein, K.G. Allen, M.G. Hayek and C.G. Aldrich, Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation, *J. Nutr. Biochem* **14** (2003), pp. 24–31.
- [6]H. Xu, B.A. Watkins and M.F. Seifert, Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry, *Calcif. Tissue Int.* **57** (1995), pp. 293–300.
- [7]F. Parhami, S.M. Jackson, Y. Tintut, V. Le, J.P. Balucan, M. Territo and L.L. Demer, Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells, *J. Bone Miner. Res.* **14** (1999), pp. 2067–2078.
- [8]N. Mody, F. Parhami, T.A. Sarafian and L.L. Demer, Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells, *Free Radic. Biol. Med.* **31** (2001), pp. 509–519.
- [9]X.C. Bai, D. Lu, J. Bai, H. Zheng, Z.Y. Ke, X.M. Li and S.Q. Luo, Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314** (2004), pp. 197–207.

- [10]F. Parhami, A.D. Morrow, J. Balucan, N. Leitinger, A.D. Watson, Y. Tintut, J.A. Berliner and L.L. Demer, Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17** (1997), pp. 680–687.
- [11]B.Y. Klein, Z. Kerem and N. Rojansky, LDL induces Saos2 osteoblasts death via Akt pathways responsive to a neutral sphingomyelinase inhibitor, *J. Cell. Biochem.* **98** (2006), pp. 661–671.
- [12]J.B. Lian, G.S. Stein, J.L. Stein and A.J. van Wijnen, Transcriptional control of osteoblast differentiation, *Biochem. Soc. Trans.* **26** (1998), pp. 14–21.